

Procédé de criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine  
IkB $\alpha$  et moyens destinés à la mise en œuvre dudit procédé

**DOMAINE DE L'INVENTION**

La présente invention se rapporte au domaine du criblage d'agents biologiquement actifs capables de moduler l'ubiquitination de la protéine 5 IkB $\alpha$ , en particulier d'agents d'intérêt thérapeutique, et encore plus spécifiquement d'agents thérapeutiques destinés à prévenir ou traiter des affections inflammatoires, des affections auto-immunes ou des cancers.

10      **ETAT DE LA TECHNIQUE**

L'un des grands problèmes médicaux non résolu demeure la mise au point de traitements effectifs des syndromes inflammatoires et auto-immuns. Ces pathologies sont actuellement traitées à l'aide de molécules comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'aspirine et l'ibuprofène, et les corticostéroïdes, molécules à l'efficacité limitée et présentant des effets toxiques non négligeables. Les inhibiteurs 15 plus spécifiques des cyclooxygénases, comme le réfécoxib et les agents bloquant le facteur de nécrose tumorale (TNF), apparus plus récemment 20 sur le marché, se sont révélés présenter les mêmes inconvénients.

Les facteurs de transcription de la famille NF- $\kappa$ B font partie des premiers moyens de défense de l'organisme lors d'infections virales, bactériennes ou fongiques et également lors de situations physiologiques de stress. 25 Ces facteurs transcriptionnels dirigent l'expression d'un nombre important de gènes, et notamment de nombreux gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation. Parmi ces gènes, on peut citer les gènes codant le facteur TNF- $\alpha$ , les interleukines IL-1, IL-6, IL-8, les molécules

d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et la E-Sélectine, la NO synthase ou encore la prostaglandine synthase Cox2.

Les facteurs de la famille NF- $\kappa$ B sont activés par une grande variété de  
5 stimuli pathogènes, aussi bien endogènes qu'exogènes, ce qui inclut des protéines ou lipides bactériens, les cytokines, les facteurs de croissance et des molécules liées à des situations de stress oxydatif. L'activation des facteurs NF- $\kappa$ B, en réponse à ces stimuli pathogènes, est observée pour la presque totalité des cellules impliquées dans la réponse immune,  
10 telles que les cellules épithéliales, les cellules du mésenchyme, les lymphocytes, les cellules neutrophiles et les macrophages.

Bien que l'étiologie exacte de la plupart des syndromes inflammatoires chroniques reste indéterminée à ce jour, des résultats expérimentaux, y compris des résultats d'études cliniques, ont montré le rôle important de l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, à la fois dans l'initiation de l'inflammation et dans l'installation d'un état d'inflammation chronique. Le blocage de l'activation des facteurs appartenant à la famille NF- $\kappa$ B constitue donc une voie efficace pour traiter des syndromes inflammatoires tels que  
15 l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les colopathies inflammatoires, telle que la maladie de Crohn, les scléroses multiples ou le psoriasis (Ballard,  
2001 ; Baud et Karin, 2001).

Il est maintenant établi que la réponse inflammatoire et l'activation du  
25 facteur NF- $\kappa$ B est étroitement liée à la destruction du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  par la voie ubiquitine protéasome (Kroll et al, 1999; Winston et al, 1999). En effet dans des cellules non stimulées ou non-activées, le facteur NF- $\kappa$ B est séquestré dans le cytoplasme des cellules. Dans des cellules non stimulées ou non activées, le facteur NF- $\kappa$ B est donc incapable d'activer  
30 l'expression des gènes cibles de ce facteur. L'activation des gènes cibles nécessite tout d'abord la translocation du facteur NF $\kappa$ B du cytoplasme

vers le noyau. Cette translocation est déclenchée par la dégradation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  par la voie ubiquitine protéasome. Le facteur I $\kappa$ B $\alpha$  est en effet une protéine qui séquestre les facteurs NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme des cellules non stimulées (Hay et al., 1999).

5

Des stimuli inflammatoires exogènes, telle qu'une infection virale ou bactérienne, activent une voie de signalisation qui provoque la phosphorylation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$ . Cette phosphorylation a lieu spécifiquement sur les résidus Sérine en positions 32 et 36 de la 10 séquence d'acides aminés du facteur I $\kappa$ B $\alpha$ . Le facteur I $\kappa$ B $\alpha$  est phosphorylé par le complexe protéique kinase I $\kappa$ K. Lorsqu'il est ainsi phosphorylé, le facteur I $\kappa$ B $\alpha$  est reconnu par l'ubiquitine ligase SCF $^{\beta}$ -TrCP (Kroll et al, 1999; Winston et al, 1999). La reconnaissance du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  par l'ubiquitine ligase SCF $^{\beta}$ -TrCP provoque la poly-ubiquitination de 15 ce facteur. Après ubiquitination, le facteur I $\kappa$ B $\alpha$  est alors reconnu et dégradé par le protéasome. La destruction du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  provoque la libération du facteur cytoplasmique NF- $\kappa$ B. Le facteur NF- $\kappa$ B subit une translocation du cytoplasme vers le noyau. Une fois localisé dans le 20 noyau des cellules stimulées, le facteur NF- $\kappa$ B reconnaît spécifiquement les promoteurs de gènes cibles et active fortement leur transcription: la réponse inflammatoire est installée (Ben Neriah, 2002).

De nombreuses données expérimentales semblent confirmer que la libération du facteur NF- $\kappa$ B, qui est induite par la dégradation du facteur 25 I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylé, constitue une étape essentielle pour l'initiation de l'inflammation et également pour l'installation d'une situation d'inflammation chronique (Magnani et al, 2000; Lewis et Manning, 1999).

Il existe un besoin dans l'état de la technique pour de nouveaux 30 composés anti-inflammatoires, que ce soit pour le traitement d'un état

inflammatoire aigu ou d'un état inflammatoire chronique. En particulier, il existe un besoin pour des composés anti-inflammatoires qui soient à la fois plus efficaces et plus spécifiques que les composés anti-inflammatoires connus. De tels composés anti-inflammatoires, du fait de leur spécificité vis-à-vis d'une cible biologique, seraient susceptibles de posséder des effets secondaires indésirables réduits, voire d'être exempts de tout effet secondaire indésirable.

Il existe aussi un besoin pour la mise au point de procédés pour identifier 10 des composés d'intérêt thérapeutique, plus spécifiquement des composés anti-inflammatoires à effet amélioré, du type de ceux ci-dessus.

### **DESCRIPTION DE L'INVENTION**

**15 Description générale du procédé de criblage de l'invention**

Selon l'invention, on a mis au point un procédé de criblage d'agents d'intérêt thérapeutique, qui sont sélectionnés pour leur spécificité d'action sur l'ubiquitination de la protéine humaine I $\kappa$ B $\alpha$  par un complexe ubiquitine ligase comprenant la protéine humaine  $\beta$ -TrCP.

20 Le demandeur a montré que, de manière surprenante, il était possible de mimer, dans des cellules de levure, le processus de dégradation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  par le protéasome, processus qui a lieu naturellement dans les cellules humaines.

25 De manière surprenante, on a montré selon l'invention qu'il était possible de créer artificiellement, dans des cellules de levure, un complexe protéique possédant l'activité ubiquitine ligase et la spécificité de reconnaissance du complexe SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$  qui est produit naturellement dans les cellules humaines. Ainsi, selon l'invention, on a reconstitué, 30 dans des cellules de levure, un complexe ubiquitine ligase artificiel comprenant des protéines de levure auxquelles est associée la protéine

humaine  $\beta$ -TrCP. En particulier, on a montré que la protéine humaine  $\beta$ -TrCP, lorsqu'elle est artificiellement exprimée dans les cellules de levure, s'associe à la protéine Skp1 de levure, laquelle protéine Skp1 de levure est contenue dans un complexe protéique ubiquitine ligase de levure. Ainsi, dans une cellule de levure dans laquelle on insérera une cassette d'expression codant la protéine humaine  $\beta$ -TrCP, la protéine  $\beta$ -TrCP s'associe au complexe protéique SCF de levure qui comprend (i) un cœur catalytique constitué de l'association des protéines Skp1, Cdc53 et Hrt1, ledit cœur catalytique étant lui-même associé à l'enzyme E2 Cdc34. On a montré que ce complexe protéique hybride levure/homme est capable de mimer, dans des cellules de levure, l'activité ubiquitine ligase exercée dans des cellules humaines par le complexe SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$  humain naturel.

15 De manière tout aussi surprenante, on a montré selon l'invention que, dans les cellules de levure, ce complexe protéique artificiel possédant l'activité ubiquitine ligase du complexe SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$  humain n'est biologiquement actif que lorsque ce complexe artificiel est localisé dans le noyau cellulaire. Au contraire, dans les cellules humaines, le complexe 20 SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$  naturel exerce son activité biologique dans le cytoplasme des cellules humaines, compartiment cellulaire dans lequel il réalise l'ubiquitination d'une seconde protéine également localisée dans le cytoplasme, le facteur I $\kappa$ B $\alpha$ . On a aussi montré selon l'invention que le complexe artificiel ubiquitine ligase qui a été mis au point n'est actif, dans 25 le processus de dégradation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$ , que lorsque le facteur I $\kappa$ B $\alpha$  est co-localisé dans le noyau avec ledit complexe artificiel ubiquitine ligase.

Ainsi, on a montré selon l'invention que, dans des cellules de levure, le 30 complexe protéique artificiel ubiquitine ligase comprenant la protéine

humaine  $\beta$ -TrCP est capable de réaliser l'ubiquitination du facteur  $I\kappa B\alpha$  humain, lorsque la protéine  $\beta$ -TrCP et le facteur  $I\kappa B\alpha$  sont artificiellement exprimés dans le noyau cellulaire.

5 Enfin, on a également montré que, dans des cellules de levure, l'ubiquitination du facteur  $I\kappa B\alpha$  par le complexe ubiquitine ligase artificiel nouveau, bien que cette ubiquitination soit réalisée dans le noyau de la cellule, et non dans le cytoplasme cellulaire, provoque néanmoins la dégradation du facteur  $I\kappa B\alpha$  ubiquitiné par le protéasome.

10

L'ensemble des résultats surprenants ci-dessus a permis au demandeur de mettre au point un procédé de criblage d'agents capables de moduler la dégradation du facteur  $I\kappa B\alpha$  dans les cellules de levure, en présence d'un complexe ubiquitine ligase artificiel mimant l'activité biologique du 15 complexe ubiquitine ligase humain  $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$  naturel.

L'invention a pour objet un procédé pour le criblage *in vitro* d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine  $I\kappa B\alpha$  par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine  $\beta$ -TrCP, ledit 20 procédé comprenant les étapes suivantes :

- (a) mettre en contact un agent candidat à tester avec des cellules de levure recombinantes qui expriment dans leur noyau :
  - (i) une protéine de fusion comprenant le polypeptide  $I\kappa B\alpha$  et au moins une première protéine détectable ; et
  - (ii) une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP ;
- (b) quantifier ladite première protéine détectable dans les cellules de levure, à la fin d'au moins une période de temps prédéterminée après la mise en contact de l'agent candidat avec lesdites cellules ;

(c) comparer la valeur obtenue à l'étape (b) avec une valeur témoin obtenue lorsque l'étape (a) est réalisée en l'absence de l'agent candidat.

5 Le procédé ci-dessus permet à l'homme du métier de déterminer si un agent à tester est capable de modifier la vitesse de dégradation, ou le degré de dégradation, du facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  par le protéasome, dans les cellules de levure exprimant à la fois la protéine  $\beta$ -TrCP et le facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  humains.

10 Le procédé de criblage *in vitro* ci-dessus, du fait qu'il met en œuvre un système d'ubiquitination artificiel humanisé dans des cellules de levure, permet un criblage d'agents qui agissent de manière spécifique sur l'activité des seules protéines humaines exprimées dans ces cellules.

15 De plus, grâce au procédé ci-dessus, on a mis au point un test physiologique de criblage d'agents actifs sur la voie ubiquitine ligase, en construisant chez la levure une voie métabolique de dégradation protéique mimant la voie de dégradation par le protéasome du facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  humain. Ainsi, du point de vue de la voie métabolique de dégradation des protéines qui est visée, le procédé de l'invention est réalisé dans des conditions physiologiques très proches des conditions physiologiques de dégradation des protéines par le protéasome humain.

20 25 Grâce au procédé ci-dessus, on peut identifier les agents capables d'inhiber la vitesse ou le degré de dégradation du facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  par le protéasome des cellules de levure. De tels agents inhibiteurs, identifiés grâce au procédé de l'invention, du fait qu'ils vont inhiber également la dégradation du facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  dans les cellule humaines, constituent des agents d'intérêt thérapeutique susceptibles d'inhiber ou de bloquer la translocation du facteur NF- $\kappa$ B dans le noyau cellulaire et, en

conséquence, inhiber ou bloquer l'activation, par NF-κB, de divers gènes impliqués dans l'inflammation, des pathologies d'auto-immunité ou encore des cancers.

5 Ainsi, le procédé de criblage *in vitro* ci-dessus peut comprendre une étape additionnelle (d) qui consiste à sélectionner positivement les agents candidats inhibiteurs pour lesquels la quantité de protéine détectable mesurée à l'étape (b) est inférieure à la valeur témoin de comparaison.

10

Le procédé de l'invention permet aussi d'identifier des agents capables d'augmenter la vitesse ou le degré de dégradation du facteur IκB $\alpha$  par le protéasome des cellules de levure. De tels agents activateurs sont susceptibles d'induire ou d'augmenter la translocation du facteur NF-κB 15 dans le noyau cellulaire et, en conséquence, d'induire ou d'augmenter l'activation, par NF-κB, de divers gènes impliqués dans l'inflammation, des pathologies d'auto-immunité ou des cancers. Ainsi, selon ce second aspect, le procédé de criblage *in vitro* de l'invention permet de cibler des agents pro-inflammatoires. Certains des agents pro-inflammatoires 20 sélectionnés selon le procédé sont susceptibles de revêtir un intérêt thérapeutique lorsqu'ils sont utilisés à faible dose ou lorsqu'ils sont administrés pendant une courte durée, par exemple en tant qu'agents inducteurs d'une réponse immune précoce, telle que l'induction d'une réaction de résistance non spécifique à l'infection ou encore telle que 25 l'activation des cellules présentatrices de l'antigène, pour l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique d'un antigène, qu'elle soit à médiation humorale ou à médiation cellulaire. Certains autres agents pro-inflammatoires sélectionnés selon le procédé de criblage *in vitro* de l'invention peuvent consister en des principes actifs connus, notamment 30 des principes actifs de médicament, dont un effet pro-inflammatoire

indésirable est identifié, et pour lesquels des précautions d'emploi particulières vis-à-vis de la santé humaine devront être observées.

Ainsi, selon un autre aspect, le procédé de criblage selon l'invention peut 5 comprendre une étape additionnelle (d) qui consiste à sélectionner positivement les agents candidats activateurs, pour lesquels la quantité de protéine détectable mesurée à l'étape (b) est supérieure à la valeur témoin de comparaison.

10 Ainsi, un agent qui « module » l'ubiquitination de la protéine β-TrCP consiste (i) en un agent qui augmente ou au contraire consiste (ii) en un agent qui inhibe ou bloque la dégradation de la protéine β-TrCP qui est détectée à l'étape (b) du procédé de criblage de l'invention, par rapport à une situation témoin de dégradation de cette protéine, lorsque le procédé 15 est réalisé en l'absence de l'agent testé.

Comme on l'aura compris, l'agent modulant l'ubiquitination de la protéine β-TrCP peut être de toute nature. Ledit agent peut être tout composé organique ou minéral, et peut être soit un agent d'origine naturelle, soit 20 un agent produit, au moins en partie, par synthèse chimique ou biologique. Ledit agent peut être notamment un peptide ou protéine. Ledit agent englobe aussi toute molécule déjà connue pour posséder un effet biologique, notamment un effet thérapeutique, ou à l'inverse un effet toxique démontré ou suspecté pour l'organisme.

25 Dans le procédé de l'invention, une fois que la protéine de fusion IκBα-protéine détectable est ubiquitinylée par le complexe SCF artificiel comprenant le polypeptide β-TrCP, ladite protéine de fusion subit une protéolyse qui est effectuée par le complexe multi-catalytique du 30 protéasome. La quantification de la protéine détectable contenue dans la cellule de levure, à un instant donné, permet de déterminer le degré de

dégradation de ladite protéine de fusion I<sub>K</sub>B<sub>α</sub>-protéine détectable, à cet instant donné.

Selon l'invention on a montré que la sensibilité du procédé de criblage 5 décrit ci-dessus est accrue lorsque, préalablement à la mise en contact des cellules de levure avec l'agent à tester, on favorise l'accumulation de la protéine cible de fusion I<sub>K</sub>B<sub>α</sub>-protéine détectable dans le noyau cellulaire.

10 Ainsi, selon un premier mode de réalisation préféré du procédé ci-dessus, l'étape (a) comprend elle-même les étapes suivantes :

- 15 (a1) cultiver les cellules de levure qui expriment dans leur noyau une protéine de fusion comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> et au moins une première protéine détectable ;
- (a2) stopper l'expression de ladite protéine de fusion comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> et au moins une première protéine détectable par les cellules de levure ;
- 20 (a3) mettre en contact les cellules de levures obtenues à la fin de l'étape (a2) avec l'agent candidat à tester.

L'arrêt de l'expression de la protéine de fusion I<sub>K</sub>B<sub>α</sub>-protéine détectable, à un moment choisi, peut être facilement réalisé par l'homme du métier, en utilisant, pour transformer les cellules de levure, une cassette 25 d'expression dans laquelle le polynucléotide codant ladite protéine de fusion est placé sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et dont l'activation, ou à l'inverse la répression, est induite par un agent inducteur. De nombreux promoteurs inductibles actifs dans des cellules de levure sont connus par l'homme du métier, 30 dont certains d'entre eux sont décrits plus loin dans la description, y compris dans les exemples.

L'accumulation de la protéine de fusion I<sub>x</sub>B<sub>α</sub>-protéine détectable dans le noyau des cellules de levure, pendant l'étape (a1) du procédé, permet l'obtention d'un fort signal de détection de la protéine détectable, au début du procédé. Ces conditions de fort signal permettent de quantifier avec une grande sensibilité la protéine détectable pendant toute la durée du procédé, au fur et à mesure de la dégradation de la protéine de fusion I<sub>x</sub>B<sub>α</sub>-protéine détectable par le protéasome, après qu'elle ait été ubiquitinylée par le complexe SCF artificiel comprenant la protéine β-TrCP. De manière évidente, plus le signal détectable de départ est fort, meilleure est la sensibilité des mesures lors de la mise en œuvre du procédé.

Selon un premier aspect du mode de réalisation ci-dessus, les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide β-TrCP durant la totalité des étapes (a1), (a2) et (a3).

Selon un second aspect du mode de réalisation ci-dessus, les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide β-TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3) et n'expriment pas la protéine comprenant le polypeptide β-TrCP durant l'étape (a1).

Selon ce second aspect, le contrôle de l'expression de la protéine comprenant le polypeptide β-TrCP est facilement réalisé, en utilisant, pour transformer les cellules de levure, une cassette d'expression dans laquelle le polynucléotide codant la protéine comprenant le polypeptide β-TrCP est placé sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et dont l'activation, ou à l'inverse la répression, est induite par un agent inducteur. De nombreux promoteurs inductibles actifs dans des cellules de levure sont connus par l'homme du métier,

dont certains d'entre eux sont décrits plus loin dans la description, y compris dans les exemples. De manière tout à fait préférée, le promoteur inductible inclus dans la cassette d'expression codant la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP est distinct du promoteur inductible 5 inclus dans la cassette d'expression codant la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable. Selon ce mode de réalisation préférentiel, on réalise un contrôle séparé respectivement (i) de l'expression de la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable et (ii) de l'expression de la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP.

10

Selon ce second aspect, la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable s'accumule dans le noyau des cellules de levure pendant l'étape (a1), en l'absence de polypeptide  $\beta$ -TrCP. Puis, à l'étape (a2) la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable qui n'est plus produite est mise en 15 présence, dans le noyau cellulaire, du complexe SCF artificiel qui comprend la protéine  $\beta$ -TrCP dont l'expression a été induite. Dans ce mode de réalisation du procédé, on accumule d'abord la protéine de fusion cible comprenant I $\kappa$ B $\alpha$ , puis on exprime la protéine effectrice de l'ubiquitination, à savoir la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP, 20 laquelle va initier le processus de dégradation de la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable. Et le processus de dégradation de la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable, qui peut être modulé par l'agent à tester, est mesuré à l'étape (b) du procédé de criblage de l'invention.

25 Selon un troisième aspect du mode de réalisation préféré du procédé de criblage de l'invention, les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3), et

(i) n'expriment pas la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP 30 pendant une durée prédéterminée, au début de l'étape (a1) ;

(ii) (ii) expriment la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP pendant la durée restante de l'étape (a1).

Selon ce troisième aspect également, la protéine de fusion  $I\kappa B\alpha$ -protéine détectable est exprimée durant la totalité de l'étape (a1) du procédé, et l'expression de ladite protéine de fusion est stoppée à l'étape (a2) du procédé.

Selon ce troisième aspect, on active l'expression de la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP à un moment choisi pendant la durée de l'étape (a1). Dans ces conditions, dans la partie (ii) de l'étape (a1), la protéine de fusion  $I\kappa B\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP sont simultanément exprimées dans les cellules de levure.

15

Selon ce troisième aspect, la protéine de fusion  $I\kappa B\alpha$ -protéine détectable s'accumule en grande quantité dans le noyau des cellules de levure durant la totalité de l'étape (a1) et la protéine effectrice comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP est exprimée précocement au cours de l'étape (a1) et continue de s'accumuler durant les étapes (a2) et (a3) pendant lesquelles la protéine de fusion cible n'est plus synthétisée. Dans ces conditions, du fait de la grande quantité de la protéine effectrice comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP accumulée dans le noyau des cellules de levure, on favorise un haut niveau de réaction d'ubiquitination de la protéine de fusion cible et donc aussi une forte activité de dégradation de la protéine de fusion cible par le protéasome, ce qui accroît considérablement la sensibilité du procédé de criblage, lorsqu'on teste des agents candidats potentiellement inhibiteurs de l'ubiquitination du polypeptide  $I\kappa B\alpha$ .

20  
25  
30

Préférentiellement, selon ce troisième aspect du procédé de l'invention, pendant l'étape (a1), l'expression de la protéine de fusion IxB $\alpha$ -protéine détectable est activée pendant une durée T1 comprise entre 0,25 heure et 10 heures, mieux entre 0,5 heure et 6 heures, et encore mieux entre 1 heure et 4 heures.

Puis, à un instant t2 déterminé, situé pendant la durée T1, on active l'expression de la protéine effectrice comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP. Préférentiellement, l'instant t2 est situé entre [T1 – 8 heures] et [T1 – 0,1 heure], mieux entre [T1 – 5 heures] et [T1 – 0,25 heure], et encore mieux entre [T1 – 3 heures] et [T1 – 0,5 heure], l'instant t2 étant, par définition, choisi à l'intérieur des limites de la durée T1 préalablement sélectionnée.

Puis, à la fin de la période de temps T1, c'est à dire au début de l'étape (a2), on stoppe l'expression de la protéine de fusion IxB $\alpha$ -protéine détectable. A partir de cet instant, seule l'expression de la protéine effectrice comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP est maintenue activée dans les cellules de levure, et ce pour la totalité de la durée restante du procédé de criblage, c'est à dire jusqu'à la fin du procédé.

20

**Description des modes de réalisation préférés du procédé de criblage**

Les modes de réalisation préférés du procédé de criblage de l'invention sont décrits ci-dessous, notamment en relation avec la description des aspects fonctionnels et structurels des divers moyens permettant la mise en œuvre dudit procédé.

De manière générale, la protéine détectable qui est comprise dans la protéine de fusion IxB $\alpha$ -protéine détectable peut être de toute nature, dès lors que sa présence, peut être spécifiquement détectée dans les

cellules de levure avant sa protéolyse, et que la présence de formes protéolysées de la protéine détectable, notamment de fragments peptidiques produits par protéolyse de ladite protéine détectable, ne sont pas détectées par le moyen de détection spécifique qui est choisi.

5

Comme cela se comprend aisément, l'activité ubiquitine ligase du complexe protéique artificiel comprenant la protéine  $\beta$ -TrCP est suivie, selon le procédé de l'invention, en mesurant son effet sur la stabilité de la protéine de fusion  $I\kappa B\alpha$ -protéine détectable. L'ajout de chaînes de poly-ubiquitine sur le facteur  $I\kappa B\alpha$ , par le complexe SCF artificiel homme/levure, entraîne la reconnaissance du facteur  $I\kappa B\alpha$  ubiquitiné par le protéasome et sa dégradation rapide par ce dernier. Grâce à l'expression dans les cellules de levure du facteur  $I\kappa B\alpha$  sous forme de protéine fusion, la dégradation de la protéine fusion contenant  $I\kappa B\alpha$  peut être suivie en temps réel, par détection de la protéine détectable non protéolysée. Selon la nature de la protéine détectable fusionnée à  $I\kappa B\alpha$ , la dégradation de la protéine fusion peut être suivie par des techniques connues en soi, notamment des techniques de mesure de fluorescence à l'aide, soit d'un cytomètre de flux, soit d'un lecteur de microplaques, soit d'un fluorimètre, soit grâce à un microscope à fluorescence, ou encore par des techniques colorimétriques, enzymatiques ou immunologiques. A titre illustratif, la protéine détectable peut être choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente ou une protéine ayant une activité enzymatique.

25

Lorsque la protéine détectable consiste en un antigène, elle peut être tout type d'antigène, dès lors que des anticorps spécifiques de cet antigène sont déjà accessibles ou, alternativement, peuvent être préparés, selon toute technique d'obtention d'anticorps, notamment d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, bien connues de l'homme du

métier. Préférentiellement, dans ce cas, la protéine détectable consiste en un antigène de faible taille, qui n'est pas susceptible d'interférer avec la reconnaissance du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  par le polypeptide  $\beta$ -TrCP. Ainsi, préférentiellement, on utilise, comme antigène, un peptide ayant une chaîne de 7 à 100 acides aminés de longueur, mieux de 7 à 50 acides aminés de longueur, et encore mieux de 7 à 30 acides aminés de longueur, par exemple 10 acides aminés de longueur. A titre illustratif, on peut utiliser l'antigène HA de séquence [NH<sub>2</sub>-YPYDVPDYA-COOH] SEQ ID N° 17, ou encore un antigène FLAG de séquence [NH<sub>2</sub>-DYKDDDDK-COOH] SEQ ID N°18 (monomère FLAG) ou de séquence [NH<sub>2</sub>-MDYKDHDGDDYKDHDIDYKDDDDK-COOH] SEQ ID N° 19 (trimère FLAG). Dans ce cas, on utilise, pour quantifier la protéine détectable à l'étape (b) du procédé, un anticorps qui reconnaît spécifiquement l'antigène compris dans la protéine de fusion, cet anticorps étant marqué directement ou indirectement. La quantification est alors réalisée par mesure du signal détectable produit par les complexes formés, dans les cellules de levure, entre l'anticorps marqué et la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -antigène. Ainsi, à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est un antigène, on quantifie ladite première protéine détectable par détection des complexes formés entre ladite protéine et des anticorps la reconnaissant.

Lorsque la protéine détectable consiste en une protéine à fluorescence intrinsèque, elle est notamment choisie parmi la protéine GFP ou l'un de ses dérivés, la protéine YFP ou l'un de ses dérivés, et la protéine dsRED. Parmi les protéines dérivées de la protéine GFP, on peut utiliser notamment l'une quelconque des protéines connues sous les noms GFPMut3, Venus, Sapphire etc. Une liste illustrative des protéines GFP susceptibles d'être utilisées dans le procédé de l'invention est présentée dans le Tableau 3, à la fin de la présente description.

La protéine à fluorescence intrinsèque peut aussi être choisie parmi les protéines auto-fluorescentes originaire de divers organismes, autres que *Aequorea victoria*. Notamment, la protéine à fluorescence intrinsèque peut être choisie parmi les protéines suivantes :

- 5 - la protéine **CopGFP** originaire de *Pontellina plumata*, et décrite par D.A. Shagin et al.(2004, *Mol. Biol. Evol.* 21:841-850) ;
- la protéine **TurboGFP**, un variant de CopGFP ; et décrite par D.A. Shagin et al., 2004 (*Mol. Biol. Evol.* 21:841-850) ;
- la protéine **J-Red**, originaire de *Anthomedusae*) ; et décrite par
- 10 D.A. Shagin et al., 2004 (*Mol. Biol. Evol.* 21:841-850) ;
- la protéine **PhiYFP** originaire de *Phialidium sp.* ; et décrite par D.A. Shagin et al.( 2004, *Mol. Biol. Evol.* 21:841-850) ;
- la protéine **mAG**, aussi appelée « monomeric Azami-Green », originaire du corail de *Galaxeidae*; et décrite par S. Karasawa et
- 15 al.(2003, *J. Biol. Chem.* 278:34167-34171) ;
- la protéine **AcGFP** originaire de *Aequorea coerulescens*, ainsi que ses variants, et décrite par N.G. Gurskaya, (2003, *Biochem. J.* 373:403-408) ; et
- la protéine **DsRed** originaire de *Discosoma sp.* ; et décrite par
- 20 M.V. Matz et al (1999, *Nature Biotech.* 17:969-973).

Lorsque la protéine détectable consiste en une protéine à fluorescence intrinsèque, on quantifie la protéine détectable à l'étape (b) du procédé par mesure du signal de fluorescence qui est émis par la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine fluorescente à l'aide de tout dispositif adapté. Ainsi, à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine fluorescente, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure du signal de fluorescence émis par ladite protéine.

30 Lorsque la protéine détectable consiste en une protéine à activité enzymatique, ladite protéine détectable est choisie notamment parmi la

luciférase et la  $\beta$ -lactamase. Dans ce cas, on quantifie la protéine détectable à l'étape (b) du procédé par mesure de la quantité du ou des composés produits par la conversion du substrat par l'enzyme . Lorsque le produit de l'activité enzymatique est coloré, la mesure peut être réalisée par colorimétrie. Lorsque le produit de l'activité enzymatique est fluorescent, on mesure l'intensité du signal de fluorescence qui est émis par ledit produit, à l'aide de tout dispositif de mesure de la fluorescence adapté. Ainsi, à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine ayant une activité enzymatique, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure de la quantité de substrat transformé par ladite protéine.

Dans un mode de réalisation particulier du procédé de criblage selon l'invention, la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP consiste également en une protéine de fusion comprenant, outre le polypeptide  $\beta$ -TrCP, également une protéine détectable. Dans ce mode de réalisation particulier, on peut suivre dans le temps le niveau d'expression du polypeptide  $\beta$ -TrCP dans les cellules de levure, en détectant, et facultativement en quantifiant, la protéine détectable contenue dans la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP. Ce mode de réalisation particulier est principalement mis en œuvre lorsque l'on contrôle positivement ou négativement l'expression de la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP, aux différentes sous-étapes de l'étape (a) du procédé. La protéine détectable contenue dans le polypeptide comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP est choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente et une protéine ayant une activité enzymatique. Préférentiellement, la protéine détectable contenue dans la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP est distincte de la protéine détectable contenue dans la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable, ce qui

permet de suivre séparément l'expression du facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  et l'expression du polypeptide  $\beta$ -TrCP dans les cellules de levure.

5 Comme cela a déjà été précédemment dans la description, la dégradation du polypeptide cible I<sub>K</sub>B $\alpha$  humain par le protéasome des cellules de levure est réalisée uniquement lorsque la protéine de fusion I<sub>K</sub>B $\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP humain sont toutes les deux co-localisées dans le noyau des cellules de levure.

10

En particulier, le demandeur a montré, comme cela est illustré dans les exemples, que le facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  est phosphorylé sur le résidu sérine en position 32 exclusivement dans le noyau des cellules de levure, alors qu'il ne subit pas de phosphorylation dans le cytoplasme. A posteriori, 15 l'événement de phosphorylation du résidu sérine en position 32 du facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$ , dans les cellules de levure, permet d'expliquer, au moins partiellement, la raison pour laquelle, dans les cellules de levure, l'ubiquitination de ce facteur ne peut être réalisée que dans le noyau cellulaire.

20

En conséquence, pour réaliser le procédé de criblage de l'invention, on met en œuvre tout moyen permettant la localisation nucléaire à la fois de la protéine de fusion I<sub>K</sub>B $\alpha$ -protéine détectable et de la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP.

25

Préférentiellement, la protéine de fusion I<sub>K</sub>B $\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP comprennent toutes les deux un peptide permettant de localiser ces deux protéines dans le noyau des cellules de levure.

30

Ainsi, de manière préférée, la protéine de fusion I<sub>K</sub>B $\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP comprennent toutes les deux, dans leur séquence en acides aminés, au moins un peptide de localisation nucléaire (« NLS ») qui est fonctionnel dans les 5 cellules eucaryotes, et plus particulièrement dans les cellules de levure. Chacune des protéines comprend, indépendamment l'une de l'autre, 1, 2, 3 ou 4 peptides de localisation nucléaire. Selon un autre aspect, chacune de ces protéines comprend, indépendamment l'une de l'autre de 1 à 4 copies d'un peptide de localisation nucléaire.

10

Préférentiellement, le ou les peptide(s) de localisation nucléaire sont choisis parmi les peptides suivants :

- 15 - le peptide NLS dérivé du grand antigène du virus SV40 ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N° 24 ;
- le peptide NLS de la nucléoplasmine ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N° 20 ;
- un peptide NLS du répresseur alpha 2 de levure choisi parmi les séquences SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22 ;
- 20 - un peptide NLS de la protéine Gal4 de levure ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N° 23.

Dans les exemples, la protéine de fusion I<sub>K</sub>B $\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP comprennent toutes les deux 25 le peptide de localisation nucléaire de séquence SEQ ID N° 24.

De préférence, le polypeptide de fusion I<sub>K</sub>B $\alpha$ -protéine détectable consiste en une chaîne d'acides aminés qui comprend, de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, respectivement (i) la 30 séquence de la protéine détectable, (ii) la séquence NLS de localisation nucléaire et (iii) la séquence de I<sub>K</sub>B $\alpha$ .

Tout d'abord, dans le polypeptide fusion, la séquence de la GFP et la séquence NLS peuvent être liées directement entre elles, par une liaison peptidique. Egalement, la séquence NLS et la séquence de I<sub>k</sub>Bα peuvent 5 être liées directement entre elles, par une liaison peptidique.

Selon un autre aspect, la séquence de GFP et la séquence NLS peuvent être séparées, dans la séquence du polypeptide de fusion, par un premier peptide espaceur.

10

Selon encore un autre aspect, la séquence NLS et la séquence de I<sub>k</sub>Bα peuvent être séparées, dans la séquence du polypeptide de fusion, par un second peptide espaceur.

15

Avantageusement, le ou les peptide(s) espaceur(s), lorsqu'il est (sont) présent(s), a (ont) une taille allant de 1 à 30 acides aminés, préférentiellement de 1 à 15 acides aminés, et de manière tout à fait préférée de 2 à 10 acides aminés de longueur.

20

Selon un mode de réalisation préféré, la protéine comprenant le polypeptide I<sub>k</sub>Bα consiste en la protéine de séquence en acides aminés SEQ ID N°2, qui peut être codée par l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1. La protéine de séquence SEQ ID N° 2 consiste, de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, respectivement en (i) la séquence de la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant de l'acide 25 aminé en position 1 jusqu'à l'acide aminé en position 240, (ii) un premier peptide espaceur allant de l'acide aminé en position 241 jusqu'à l'acide aminé en position 243, (iii) le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant de l'acide aminé en position 244 jusqu'à l'acide aminé en position 30 250, (iv) un second peptide espaceur allant de l'acide aminé en position 251 jusqu'à l'acide aminé en position 255 et (v) le polypeptide I<sub>k</sub>Bα allant de l'acide aminé en position 256 jusqu'à l'acide aminé en position 572.

L'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1 consiste, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', respectivement en (i) la séquence codant la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 714, (ii) la séquence codant un premier peptide espaceur allant du nucléotide en position 715 jusqu'au nucléotide en position 729, (iii) la séquence codant le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant du nucléotide en position 730 jusqu'au nucléotide en position 750, (iv) la séquence codant un second peptide espaceur allant du nucléotide en position 751 jusqu'au nucléotide en position 765 et (v) 5 la séquence codant le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  allant du nucléotide en position 766 jusqu'au nucléotide en position 1719.

Préférentiellement, la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ TrCP consiste en une chaîne d'acides aminés qui comprend, de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, respectivement (i) la 15 séquence d'une seconde protéine détectable, (ii) la séquence NLS de localisation nucléaire, et (iii) la séquence de  $\beta$ TrCP.

Selon un mode de réalisation préféré, la protéine comprenant le 20 polypeptide  $\beta$ -TrCP consiste en la protéine de séquence en acides aminés SEQ ID N° 4, qui est codée par l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3. La protéine de séquence SEQ ID N° 4 consiste, de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, respectivement en (i) la 25 séquence de la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant de l'acide aminé en position 1 jusqu'à l'acide aminé en position 240, (ii) un premier peptide espaceur allant de l'acide aminé en position 241 jusqu'à l'acide aminé en position 243, (iii) le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant de l'acide aminé en position 244 jusqu'à l'acide aminé en position 250, (iv) un second peptide espaceur 30 allant de l'acide aminé en position 251 jusqu'à l'acide aminé en position 255 et (v) le polypeptide  $\beta$ -TrCP allant de l'acide aminé en position 256

jusqu'à l'acide aminé en position 860. L'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 consiste, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', respectivement en (i) la séquence codant la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 714, (ii) la 5 séquence codant un premier peptide espaceur allant du nucléotide en position 715 jusqu'au nucléotide en position 729, (iii) la séquence codant le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant du nucléotide en position 730 jusqu'au nucléotide en position 750, (iv) la séquence codant un second peptide espaceur allant du nucléotide en position 751 10 jusqu'au nucléotide en position 765 et (v) la séquence codant le polypeptide  $\beta$ -TrCP allant du nucléotide en position 766 jusqu'au nucléotide en position 2538.

Selon encore un autre aspect, le procédé de criblage selon l'invention est 15 caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes sont transformées avec :

- (1) un premier polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture ouvert codant (i) la protéine de fusion comprenant le polypeptide I $\kappa$ B $\alpha$ , (ii) une séquence de localisation nucléaire et (iii) une première protéine détectable, et (b) une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert; et  
20
- (2) un second polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture ouvert codant (i) une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP, (ii) une séquence de localisation nucléaire, et (iii) une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert;

30 Le polynucléotide (1) ci-dessus peut consister en l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1.

Le polynucléotide (2) ci-dessus peut consister en l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3.

5    **Acides nucléiques, vecteurs d'expression et cellules de levure transformées préférés selon l'invention.**

On synthétisé selon l'invention des acides nucléiques, lesquels, lorsqu'ils sont introduits dans des cellules de levure, provoquent l'expression 10 respectivement de la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable et de la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP dans ces cellules, et plus particulièrement dans le noyau des cellules de levure.

Tout d'abord, chacun des acides nucléiques synthétisés comprend une 15 séquence codante, qui est aussi désignée « cadre de lecture ouvert » ou « ORF », qui code la protéine d'intérêt, respectivement soit la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable, soit la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP, ladite protéine d'intérêt comprenant aussi dans sa séquence au moins la séquence d'un peptide de localisation nucléaire. 20 Des exemples illustratifs des acides nucléiques selon l'invention sont les acides nucléiques de séquence SEQ ID N°1 et SEQ ID N°3, dont la structure a été décrite précédemment dans la description.

Chacun des acides nucléiques comprend aussi une séquence régulatrice 25 comprenant un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure.

Selon un premier mode de réalisation préféré, le promoteur fonctionnel dans les cellules de levure consiste en un promoteur constitutif qui peut être choisi parmi les promoteurs *PGK1*, *ADH1*, *TDH3*, *LEU2* et *TEF1*.

Péférantiellement, dans le but de contrôler précisément les périodes durant lesquelles sont exprimées respectivement la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP, chacun des acides nucléiques comprend, en tant que promoteur,

5 un promoteur dit « inductible », c'est à dire un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur. On peut utiliser un promoteur lequel, lorsque l'agent inducteur est ajouté dans le milieu de culture des cellules de levure, active l'expression de la séquence codant la protéine d'intérêt placée sous son

10 contrôle. On peut aussi utiliser un promoteur lequel, lorsque l'agent inducteur est ajouté dans le milieu de culture des cellules de levure, réprime ou bloque l'expression de la séquence codant la protéine d'intérêt placée sous son contrôle.

15 Ainsi, selon un second mode de réalisation préféré d'un promoteur, le promoteur inductible qui est contenu dans les acides nucléiques de l'invention est choisi parmi *CUP1*, *GAL1*, *MET3*, *MET25*, *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

20 Dans un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique ou le polynucléotide qui code la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable comprend la séquence régulatrice *GAL1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide I $\kappa$ B $\alpha$  en présence de glucose.

25 Ainsi, dans un mode de réalisation avantageux du procédé de criblage de l'invention, l'expression de la protéine fusion comprenant le facteur I $\kappa$ B $\alpha$  est réalisée de manière temporaire durant l'essai de criblage. Après avoir été induite durant un temps fixé pouvant varier de 20 minutes à 24

30 heures, l'expression de la protéine contenant I $\kappa$ B $\alpha$  est spécifiquement stoppée (dans une expérience connue par l'homme du métier sous le

nom de « promoter shut off ») avant d'exposer les cellules aux molécules devant être ciblées. Cet arrêt de l'expression est obtenu par l'addition (ou la suppression) dans le milieu de culture d'une molécule pouvant réprimer l'activité du promoteur contrôlant l'expression de la protéine tripartite contenant I<sub>K</sub>B $\alpha$ .

Ainsi, lorsque la protéine de fusion I<sub>K</sub>B $\alpha$ -protéine détectable est exprimée sous le contrôle du promoteur du gène *GAL1*, alors l'expression de ce promoteur est réprimée en ajoutant du glucose à la concentration finale de 2 % dans le milieu de culture. L'arrêt de la néo-synthèse de la protéine de fusion comprenant I<sub>K</sub>B $\alpha$  permet de mesurer sa stabilité en temps réel, en déterminant par exemple la fluorescence des cellules de levure au cours du temps après l'arrêt de synthèse, dans le mode de réalisation dans lequel ladite protéine de fusion contient une protéine détectable à fluorescence intrinsèque, comme la GFP ou une protéine dérivée de la GFP.

Dans un autre mode particulièrement avantageux du procédé de criblage selon l'invention, l'expression temporaire de la protéine fusion comprenant le facteur I<sub>K</sub>B $\alpha$  est associée à une expression également temporaire de la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP. Dans ce mode de réalisation, la protéine de fusion comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  est exprimée pendant la période de temps T1 choisie, par exemple en utilisant des cellules de levure qui expriment la protéine de fusion comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  sous le contrôle du promoteur *GAL1* et qui sont cultivées en présence de 0, 5 à 4 % de galactose pendant la durée T1. A l'instant t2, l'expression de la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP est induite. Cette induction est par exemple obtenue, chez des cellules exprimant la protéine contenant  $\beta$ -TrCP sous le contrôle du promoteur du gène *CUP1*, en ajoutant dans le milieu de

culture une concentration de sulfate de cuivre comprise entre 0.05 mM et 5 mM. A la fin de la période de temps T1, l'expression de la protéine de fusion comprenant I<sub>K</sub>B $\alpha$  est stoppée en ajoutant dans le milieu de culture du glucose à une concentration comprise entre 0.5 et 2 %. Cet ajout de 5 glucose n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine comprenant  $\beta$ -TrCP à partir du promoteur du gène *CUP1*. Ainsi dans ce mode de mise œuvre du procédé, l'accumulation de l'ubiquitine ligase comprenant  $\beta$ -TrCP est poursuivie, alors que la néo-synthèse de la protéine de fusion comprenant I<sub>K</sub>B $\alpha$  est stoppée.

10

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier du procédé de criblage selon l'invention, l'acide nucléique ou le polynucléotide qui code la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP comprend la séquence régulatrice *CUP1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert 15 codant une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP en présence de sulfate de cuivre.

Ainsi, l'invention a aussi pour objet une cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide 20 codant qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

25

Une telle cassette d'expression peut notamment consister en l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1 selon l'invention, qui code la protéine de fusion GFP-NLS-I<sub>K</sub>B $\alpha$  de séquence SEQ ID N°2.

L'invention concerne aussi une cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

Une telle cassette d'expression peut notamment comprendre l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 selon l'invention, qui code la protéine de fusion GFP-NLS- $\beta$ TrCP de séquence SEQ ID N°4.

10

Selon un premier mode de réalisation préféré d'une telle cassette d'expression, la séquence régulatrice comprend un promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure, tel qu'un promoteur choisi parmi les promoteurs *PGK1*, *ADH1*, *TDH3*, *LEU2* et *TEF1*.

15

Selon un second mode préféré d'une telle cassette d'expression, dans l'une ou l'autre des cassettes d'expression ci-dessus, ou dans les deux, la séquence régulatrice contenue dans ledit polynucléotide, la séquence régulatrice contenue dans le second polynucléotide, ou les deux séquences régulatrices, comprenne(nt) un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur, qui est aussi appelé promoteur inductible.

De manière tout à fait préférée, le promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *CUP1*, *GAL1*, *MET3*, *MET25*, *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de criblage selon l'invention, les cellules de levure sont transformées par (i) l'acide nucléique ou le polynucléotide comprenant la séquence codant la protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable ainsi que par (ii) l'acide

nucléique ou le polynucléotide codant la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP, qui se présentent sous une forme non intégrée, par exemple sous la forme de vecteurs fonctionnels dans les cellules de levure et qui portent au moins une origine de réPLICATION fonctionnelle  
5 dans les cellules de levure.

Dans encore une autre mode de réalisation du procédé de criblage selon l'invention, les cellules de levure recombinantes possèdent l'acide nucléique ou le polynucléotide comprenant la séquence codant la  
10 protéine de fusion I $\kappa$ B $\alpha$ -protéine détectable ainsi que l'acide nucléique ou le polynucléotide codant la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP sous une forme intégrée dans leur génome, comme cela est illustré dans les exemples.

15 De manière générale, pour la mise en œuvre du procédé de criblage de l'invention, il est avantageux d'utiliser des cellules de levures qui possèdent une bonne perméabilité membranaire, notamment une bonne perméabilité membranaire pour les agents à tester par le procédé.

20 Pour la mise en œuvre du mode de réalisation préféré du procédé de criblage de l'invention dans lequel l'expression des deux protéines d'intérêt est réalisée sous le contrôle de promoteurs inductibles, il est également avantageux d'utiliser des cellules de levures qui possèdent une bonne perméabilité membranaire pour les composés inducteurs vis-à-vis desquels lesdits promoteurs inductibles sont sensibles  
25

Ainsi, dans un autre mode de réalisation préféré du procédé de criblage de l'invention, on utilise des souches de levure dont le génome comprend une à plusieurs mutations qui augmentent la perméabilité aux  
30 produits à tester, telles que des mutations inactivant les gènes *PDR1* et *PDR3*, deux gènes codant des facteurs transcriptionnels qui chez la

levure contrôlent l'expression de transporteurs insérés dans la membrane plasmique (Vidal et al, 1999, Nourani et al, 1997).

Préférentiellement, on utilise des souches de levure possédant le fond génétique de la souche W303 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* décrite par Bailis et al. (1990), ou tout autre souche caractérisée de la dite levure *Saccharomyces cerevisiae*.

La transformation des cellules de levure par de l'ADN exogène est préférentiellement en utilisant des techniques connues de l'homme du métier, notamment la technique décrite par Schiestl et al. (1989). Les constructions des différentes souches de levure ont été réalisées en employant des techniques de génétique (croisement, sporulation dissection des asques et analyse phénotypique des spores) connues et décrites notamment par Sherman et al. (1979) et les techniques de génétique inverse décrites notamment par Rothstein (1991).

Conformément à l'invention, les levures sont transformées préférentiellement par des plasmides construits selon des techniques de biologie moléculaire classiques, notamment selon les protocoles décrits par Sambrook et al. (1989) et Ausubel et al. (1990-2004).

Ainsi, un autre objet de l'invention consiste en un vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression telle que définie dans la présente description.

Un premier vecteur conforme à l'invention est le vecteur pCSY226-NLS-IkB $\alpha$  qui est décrit dans les exemples, et qui a servi à la construction de la souche de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris sous le numéro d'accès I-3187.

Un second vecteur conforme à l'invention est le vecteur pCSY226-NLS- $\beta$ -TrCP qui est décrit dans les exemples, et qui a servi à la construction de la souche de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris sous le numéro d'accès I-3187.

La présente invention est également relative à une souche de levure recombinante comprenant, sous une forme intégrée dans son génome,

10

- (i) un premier polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide I $\kappa$ B $\alpha$  et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert; et
- (ii) un second polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert;

20

En particulier, l'invention est relative à une souche de levure recombinante conforme à la définition ci-dessus, qui consiste en la souche de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM) sous le numéro d'accès I-3187.

L'invention concerne aussi une trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine  $\beta$ -TrCP, caractérisé 30 en ce qu'il comprend :

- (i) un premier vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide I $\kappa$ B $\alpha$  telle que définie ci-dessus ; et
- 5 (iii) un second vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression codant la protéine comprenant le polypeptide BTrCP telle que définie ci-dessus.

L'invention est aussi relative à une trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  par un complexe 10 protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine  $\beta$ -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes comprenant, sous une forme insérée dans leur génome, respectivement :

- (i) une cassette d'expression codant la protéine de fusion comprenant 15 le polypeptide I $\kappa$ B $\alpha$  telle que définie ci-dessus ; et
- (ii) une cassette d'expression codant la protéine comprenant le polypeptide BTrCP telle que définie ci-dessus.

Préférentiellement, la trousse ou kit ci-dessus comprend des cellules de 20 levures recombinantes de la souche de levure CYS 135 déposée à la CNCM sous le numéro d'accès II-3187.

Le procédé de criblage selon l'invention, permet de visualiser l'activité de 25 l'ubiquitine ligase SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$  vis à vis du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  humain, substrat de la voie ubiquitine protéasome de dégradation des protéines. Ce procédé est particulièrement avantageux pour cribler des molécules ou agents aptes à agir sur les pathologies liées à l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B et aux dysfonctionnements de la voie NF- $\kappa$ B chez l'homme tels que les syndromes inflammatoires et immuns, certains cancers, certaines

maladies comme la « reperfusion injury » et les infections fongiques, bactériennes et virales.

**Les principaux avantages du procédé de criblage de l'invention sont notamment les suivants :**

- la simplicité de mise en œuvre: l'induction de l'activité de l'ubiquitine ligase  $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$  vis -à-vis du facteur  $I\kappa B\alpha$  est réalisée simplement grâce à l'expression contrôlée des facteurs humains  $I\kappa B\alpha$  et  $\beta\text{-TrCP}$  dans les cellules de levure. De plus, lorsque le facteur  $I\kappa B\alpha$  est exprimé en tant que protéine hybride en fusion avec une protéine à fluorescence intrinsèque, telle que la GFP, l'activité de l'ubiquitine ligase  $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$  artificielle vis-à-vis du facteur  $I\kappa B\alpha$  est directement mesurée par la quantification de la fluorescence émise par la protéine hybride. De même lorsque le facteur  $I\kappa B\alpha$  est exprimé en tant que protéine hybride en fusion avec une protéine telle que la luciférase, l'activité de l'ubiquitine ligase  $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$  artificielle vis-à-vis du facteur  $I\kappa B\alpha$  est directement mesurée par la quantification de la luminescence émise par la protéine hybride en présence d'un substrat comme la fluorescéine.
- l'adéquation avec un contexte thérapeutique: l'activité de l'ubiquitine ligase  $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$  artificielle vis-à-vis du facteur  $I\kappa B\alpha$  est suivie selon un test fonctionnel réalisé dans des cellules entières. Le procédé de criblage *in vitro* selon l'invention permet donc de sélectionner des molécules capables d'activer ou d'inhiber la dégradation d' $I\kappa B\alpha$  dans un contexte semblable à celui de leur usage thérapeutique final.
- la spécificité: bien que réalisé *in vitro* dans la cellule, le procédé de criblage selon l'invention est spécifique, car il repose sur la co-expression, dans un organisme hétérologue à l'organisme humain,

des deux protéines humaines I $\kappa$ B $\alpha$  et  $\beta$ -TrCP. Les molécules sélectionnées grâce au procédé de criblage de l'invention seront spécifiques de ce couple ubiquitine ligase  $\beta$ -TrCP / protéine substrat I $\kappa$ B $\alpha$ , et ne seront donc pas des molécules sélectionnées en raison, par exemple, de leur capacité à interférer avec l'une des nombreuses voies de signalisation induisant la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les cellules humaines. En effet, lors de la mise en œuvre du procédé de criblage selon l'invention, la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$  artificielle, est induite par une voie métabolique tout à fait artificielle et totalement reproductible, comme par exemple, l'ajout de glucose pour bloquer l'activité du promoteur GAL1, lorsque I $\kappa$ B $\alpha$  est exprimé sous le contrôle de ce promoteur.

- la stabilité des souches de levure recombinantes: les techniques d'intégration dans un endroit choisi d'un chromosome de levure, et de remplacement ciblé de gènes permettent la construction de souches de levures recombinantes exprimant les protéines humaines hybrides contenant soit I $\kappa$ B $\alpha$  soit  $\beta$ -TrCP à partir des chromosomes de la levure. Ces souches de levure recombinantes sont donc génétiquement stables et peuvent être multipliées et conservées indéfiniment.

- la rapidité de croissance et de criblage: la levure est un micro-organisme à croissance rapide et rendement élevé. En particulier, le procédé de criblage de l'invention est préférentiellement réalisé en cultivant les cellules de levure dans un milieu de culture complet, dans lequel la croissance des cellules de levure est particulièrement rapide et le rendement particulièrement élevé, ce qui permet l'obtention d'une grande quantité de cellules de levure recombinantes pour la réalisation simultanée d'un nombre important de tests de criblage.

- le faible coût: la levure est un microorganisme dont la culture, le stockage et la caractérisation sont peu onéreux,
- l'automatisation du procédé de criblage de l'invention: la levure est un microorganisme dont la culture, réalisée dans un faible volume de milieu, à température basse, en atmosphère classique, dans l'air, est tout particulièrement adapté à l'automatisation (robotisation) des procédés de criblage.

Le procédés de criblage selon l'invention sont utiles notamment pour  
10 sélectionner et caractériser des agents actifs tels que des agents anti-inflammatoires, anticancéreux, anti-viraux, des agents contre des infections fongiques, bactériennes ou virales.

La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être  
15 limitée, par les figures et les exemples suivants.

## **FIGURES**

La figure 1 illustre la possibilité pour les protéines Skp1 de levure et  
20 β-TrCP humaine d'interagir dans les cellules de levure.

En abscisse : les plasmides présents dans les cellules de levure transformées ; En ordonnée, l'activité β-galactosidase, exprimée en nanomoles de substrat transformé par minute et par mg de protéines cellulaires.

La figure 2 illustre les localisations dans les cellules de levures des protéines humaines IκBα et β-TrCP selon qu'elles sont fusionnées ou non à une séquence NLS de SV40.  
30 Ligne supérieure : clichés de microscopie à fluorescence de coloration de l'ADN des noyaux cellulaires avec le colorant Hoechst 333-42.

Ligne inférieure : clichés de microscopie à fluorescence permettant de localiser dans les cellules l'expression de la GFP.

5 A : Cellules transformées par le vecteur GFP-NLS- $\beta$ -TrCP ; B : cellules transformées par le vecteur GFP- $\beta$ -TrCP ; C : cellules transformée par le vecteur GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$  ; D : cellules transformées par le vecteur GFP-I $\kappa$ B $\alpha$ .

10 La figure 3 illustre comment l'adressage de la protéine humaine I $\kappa$ B $\alpha$  dans le noyau des cellules de levure induit sa phosphorylation sur les séries 32 et 36.

La figure représente un gel d'électrophorèse des protéines cellulaires des souches de levure recombinantes CYS22 et CYS126,  
15 respectivement.

20 La figure 4 illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$  dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- $\beta$ -TrCP.

Les figures 4A à 4D représentent des clichés de microscopie par fluorescence : ligne supérieure, coloration de l'ADN des noyaux cellulaires avec le colorant Hoechst 333-42 ; ligne inférieure, clichés de microscopie à fluorescence permettant de localiser dans les cellules l'expression de la GFP.  
25

Figure 4A : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS22 ; Figure 4B : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS61.  
30

Figure 4C : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS126.

5 Figure 4D : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS135.

En ordonnées : les différents temps après l'ajout de glucose dans les cultures cellulaires, exprimés en minutes.

10 La figure 5 illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$  dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment ou non la protéine fusion tripartite Flag-NLS- $\beta$ -TrCP.

15 Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes CYS135, CYS126, CYS61 et CYS22, respectivement, qui sont indiquées par des encadrés sur la figure.

20 En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes ; en ordonnée : moyenne de l'intensité du signal de fluorescence, exprimée en unités arbitraires de fluorescence.

25 La figure 6 illustre par une analyse biochimique de type Western Blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$  dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- $\beta$ -TrCP.

Clichés de gels d'immuno-empreinte (« Western blotting ») révélés avec des anticorps anti-GFP et des anticorps anti-peptide FLAG

30 En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes.

Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes suivantes : CYS22 (Figure 6A), CYS61 (Figure 6B), CYS126 (Figure 6C) et CYS135 (Figure 6D).

5

La figure 7 illustre par une analyse biochimique de type Western blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite mutante GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ [S3236A] dans laquelle les sites de phosphorylation Ser32 et Ser36 ont été remplacés par des résidus Ala, mutations qui dans des cellules humaines rendent la protéine non-dégradable.

10 Clichés de gels d'immuno-empreinte (« Western blotting ») révélés avec des anticorps anti-GFP et des anticorps anti-peptide FLAG

15 En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes.

Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes suivantes : CYS138 (Figure 7A) et CYS139 (Figure 7B).

20

La figure 8 illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ [S3236A] dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- $\beta$ -TrCP.

25

Les figures 8A et 8B représentent des clichés de microscopie à fluorescence : ligne supérieure, coloration de l'ADN des noyaux cellulaires avec le colorant Hoechst 333-42 ; ligne inférieure, clichés de microscopie à fluorescence permettant de localiser dans les cellules l'expression de la GFP.

Figure 8A : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS138 ; Figure 8B : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS139.

5 En ordonnées : les différents temps après l'ajout de glucose dans les cultures cellulaires, exprimés en minutes.

La figure 9 illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ [S3236A] dans 10 les souches de levure décrites ci-dessus.

Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes CYS138 et CYS139, respectivement, qui sont indiquées par des encadrés sur la figure.

15 En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes ; en ordonnée : moyenne de l'intensité du signal de fluorescence, exprimée en unités arbitraires de fluorescence.

20 **EXEMPLES**

**Exemples 1 à 3 : Construction des vecteurs recombinants selon l'invention.**

**A. MATERIEL ET METHODES DES EXEMPLES 1 A 3.**

25 **A.1. Récapitulatif des séquences de polynucléotide utilisées**

La séquence de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  est celle décrite dans Strausberg et al. (PNAS (1999), 99(26) : 16899-16903).

La séquence de la sous unité réceptrice  $\beta$ -TrCP du complexe ubiquitine ligase SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$  est celle décrite dans Yaron et al. (Nature (1998) 396(6711) : 590-594).

5 La séquence du gène GFP d'*Aequora victoria* et de son produit la Green Fluorescent Protein mut3 dont la séquence est optimisée pour l'expression en levures (*yEGFP3*) (désignée ci-après sous le terme GFP) est celle décrite dans Cormack et al. (Gene (1996) 173 (1) : 33-38).

10 La séquence de localisation nucléaire « NLS » du grand antigène T codée par le virus SV40 est la traduction de la séquence nucléique ;

« 5' ACCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATT 3' » (SEQ ID N°25).

15 La séquence du plasmide pRS306 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) 122(1) : 19-27).

La séquence du plasmide pRS304 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) 122(1) : 19-27).

20

La séquence du plasmide pRS314 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) 122(1) : 19-27).

25 La séquence du plasmide pRS316 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) 122(1) : 19-27).

La séquence du plasmide pSH18-34 qui contient quatre opérateurs LexA placé en amont du gène LacZ est celle décrite par Hanes et Brent (Cell (1989), 57:1275-1293)

30

La séquence du plasmide pLexSkp1-1, qui permet l'expression de la protéine Skp1 de levure fusionnée à la protéine bactérienne LexA, est celle décrite dans Patton et al. (Genes & Dev (1998), 12 :692-705)

- 5 La séquence du plasmide pGAD $\beta$ TrCP, qui permet l'expression de la protéine humaine  $\beta$ -TrCP fusionnée au domaine activateur du facteur transcriptionnel Gal4 de levure est celle décrite dans Margotin et al. (Molec. Cell (1998), 1 :565-574).
- 10 La séquence du promoteur du gène GAL1 de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Johnston et Davis (Mol. Cell. Biol. (1984) 4 (8) : 1440-1448).
- 15 La séquence du promoteur du gène MET3 de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite dans Charest et al. (Mol. Gen. Genet. (1987) 210 (2) : 307-313).
- 20 La séquence du promoteur du gène MET28 de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite dans Kuras et al. (EMBO J. (1996) 15(10) : 2519-2529).
- 25 La séquence du promoteur du gène TEF1 de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Schaaff-Gerstenschlager et al. (Eur. J. Biochem. (1993) 217 (1) : 487-492).
- 30 La séquence du promoteur du gène SAM4 de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Thomas et al. (J. Biol. Chem. (2000) 275(52) : 40718-40724).

La séquence du promoteur du gène MET25 de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite dans Kerjan et al. (Nucleic Acids Res.(1986) 14(20) : 7861-7871).

La séquence du promoteur du gène *PHO5* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Feldmann et al. (EMBO J. (1994) 13(24) : 5795-5809).

5

La séquence du promoteur du gène *CUP1* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Karin et al. (PNAS (1984) 81(2) : 337-341).

10 La séquence du promoteur du gène *PGK1* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Bolle et al. (Yeast (1992) 8(3) : 205-213).

15 La séquence du promoteur du gène *ADH1* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Bennetzen et Hall (J. Biol. Chem. (1982) 257(6) : 3018-3025).

20 La séquence du promoteur du gène *TDH3* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Arroyo et al. Non publié (1996) soumission directe au MIPS).

La séquence du promoteur du gène *LEU2* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Rad et al. (Yeast (1991) 7(5) : 533-538).

25

### A.2. Conventions utilisées

Les descriptions sont faites en utilisant la nomenclature et les règles typographiques en usage dans la communauté des biologistes spécialistes de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

- le nom de la forme sauvage d'un gène est donné en majuscule italique ; exemple : *GAL1*.
- le nom d'une forme mutante d'un gène est donné en minuscule italique, le numéro d'allèle si il est connu est précisé à la suite d'un tiret ; exemple *cup1-1*.
- le nom d'un allèle inactivé d'un gène est donné en minuscule suivi de 2 fois deux points suivi du nom du gène inactivant ex *ppr1::TRP1* (dans cet exemple le gène inactivé *ppr1* a été interrompu par le gène actif *TRP1*).

Alternativement, le nom d'un gène inactivé peut être donné par le symbole « *delta* » ; exemple *gal4Δ*

- le nom de la protéine est celui du gène qui la code est donné en minuscule, excepté la première lettre qui est en majuscule ex *Gal4* (alternativement on peut utiliser le même symbole suivi d'un p ; exemple *Gal4p*).

### A.3. Remarques préliminaires concernant la construction des plasmides

L'ensemble des plasmides a été construit par des techniques de biologie moléculaire classiques selon des protocoles décrits par Sambrook et al. (in Molecular Cloning, Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition, (1989), Cold Spring Harbor, N. Y.) et Ausubel et al., (in Current Protocols in Molecular Biology, (1990-2004), John Wiley and Sons Inc, N.Y.). Le clonage, la

propagation et la production d'ADN plasmidiques ont été réalisés dans la souche d'*Escherichia coli* DH10B.

**EXEMPLE 1 : Construction des plasmides permettant l'expression chez la levure des protéines fusions GFP-IkBα et GFP-NLS-IkBα.**

Les plasmides suivants permettent l'expression chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de dérivés de la protéine humaine IkBα fusionnés à un variant de la Green Fluorescente Protéine (GFP) d'*Aequora victoria*. Selon le plasmide construit, les protéines fusions construites comprennent ou non la séquence de localisation nucléaire du grand antigène T du virus SV40. L'introduction de cette séquence permet l'adressage dans le compartiment nucléaire des protéines fusion qui la comprennent.

Un fragment de 620 paires de bases (pb) correspondant au promoteur du gène *GAL1* (pGAL1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « pGAL1(Asp)Forw » de séquence 5'-GCTGGGTACCTTAATAATCATATTACATGGCATT-3 [SEQ ID N°6] et « pGAL1(EcoRI)Rev » de séquence 5'- GGCGGAATTCTATAGTTTTCTCCTTGACGTTA-3' [SEQ ID N°7].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Asp718I* et *EcoRI* et inséré dans le plasmide navette *S.cerevisiae-E.coli* pRS306 préalablement digéré par les enzymes *Asp718I* et *EcoRI*, produisant le vecteur pRS306-pGAL1.

Un fragment de 720 paires de bases (pb) correspondant à un variant du gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) d'*Aequora victoria*,

dont la séquence est optimisée pour l'expression en levures (*yEGFP3*), a été amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir du vecteur pUC19-*yEGFP3*, en utilisant les oligonucléotides « GFPEcoRI5' » de séquence 5'-GGTCGGAATTCATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC-3'

5 [SEQ ID N° 8] et « PBamHI(SmaI/SrfI PstI)3' » de séquence  
5'-  
GGCGGGATCCGCCCGGGCTCTGCAGTTGTACAATTCCATCCATACC  
-3' [SEQ ID N°9]. Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1

10 préalablement digéré par les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI, produisant le vecteur pRS306-pGAL1-*yEGFP3*.

Un fragment de 340 paires de bases (pb) correspondant au terminateur du gène *ADH1* (tADH1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été  
15 amplifié par Polymérase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « TermADH1(NotI/BstXI)5' » de séquence

5'-  
GGCGGCGGCCGCCACCGCGGTGGCGAATTCTTATGATTATG-3'  
20 [SEQ ID N°10] et « TermADH1(SacI)3' » de séquence  
5'-GGCGGAGCTCTGGAAGAACGATTACAACAG-3' [SEQ ID N°11].  
Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Sac*I et *Not*I et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1-*yEGFP3* préalablement digéré par les enzymes *Sac*I et *Not*I, produisant le vecteur pCSY226.

25  
Le gène codant pour la protéine *IκBa* a été purifiée à partir du plasmide pGad1318-*IκBa* par digestion par l'enzyme de restriction *Xba*I suivi d'un traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymerase I afin de transformer l'extrémité cohésive en 3' du fragment en extrémité franche,  
30 puis d'une seconde digestion par l'enzyme de restriction *Bam*HI pour l'extrémité 5' du gène. Le fragment a été cloné dans le plasmide

pCSY226 préparé par une digestion par l'enzyme de restriction *Kpn*I, suivie d'un traitement avec le fragment de Klenow, puis d'une digestion par l'enzyme de restriction *Bam*HI. Le vecteur produit a été appelé pCSY226-I $\kappa$ B $\alpha$ .

5

Une version de ce vecteur contient en plus la séquence d'adressage nucléaire NLS. Celle-ci a été obtenue en synthétisant une paire d'oligonucléotides complémentaire de séquence

« NLS-5' » : 5'ACCTCCAAAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATT-3' [SEQ ID 10 N°12], et

« NLS-3' » : 5'-AATTCGACCTTCTCTTTGGAGGT-3' [SEQ ID N°26].

réhybridés pour former un ADN double brin. Ce fragment d'ADN a ensuite été incorporé dans le vecteur pCSY226-I $\kappa$ B $\alpha$  digéré par l'enzyme de restriction *Sce*FI pour donner le vecteur pCSY226-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ .

**EXEMPLE 2 : Construction des plasmides permettant l'expression chez la levure des protéines fusions GFP- $\beta$ -TrCP et GFP-NLS- $\beta$ -TrCP.**

20

Les plasmides suivants permettent l'expression chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de dérivés de la protéine humaine  $\beta$ -TrCP fusionnés à un variant de la Green Fluorescente Protéine (GFP) d'*Aequora victoria*. Selon le plasmide construit, les protéines fusions construites comprennent ou non la séquence de localisation nucléaire du grand antigène T du virus SV40. L'introduction de cette séquence permet l'adressage dans le compartiment nucléaire des protéines fusion qui la comprennent.

30 Un fragment de 620 paires de bases (pb) correspondant au promoteur du gène *GAL1* (pGAL1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été

amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « pGAL1(Asp)Forw » de séquence  
5'-GCTGGGTACCTTAATAATCATATTACATGGCATT-3' [SEQ ID N°6] et  
« pGAL1(EcoRI)Rev » de séquence  
5'- GGCAGGAATTCTATAGTTTTCTCCTTGACGTT-3' [SEQ ID N°7].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction Asp718I et EcoRI et inséré dans le plasmide navette *S.cerevisiae-E.coli* pRS306 préalablement digéré par les enzymes Asp718I et EcoRI, produisant le vecteur pRS306-pGAL1.

Un fragment de 720 paires de bases (pb) correspondant à un variant du gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) d'*Aequora victoria*, dont la séquence est optimisée pour l'expression en levures (*yEGFP3*), a été amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir du vecteur pUC19-*yEGFP3*, en utilisant les oligonucléotides « GFPEcoRI5' » de séquence  
15 5'-GGTCAGGAATTCTATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC-3' [SEQ ID N°8] et « GFPBamHI(SmaI/SrfI PstI)3' » de séquence  
20 5'-  
GGCGGGATCCGCCGGGCTCTGCAGTTGTACAATTCCATACC  
-3' [SEQ ID N°9].

25 Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1 préalablement digéré par les enzymes BamHI et EcoRI, produisant le vecteur pRS306-pGAL1-*yEGFP3*.

Un fragment de 340 paires de bases (pb) correspondant au terminateur du gène *ADH1* (*tADH1*) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été amplifié par Polymérase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant 5 les oligonucléotides « TermADH1(NotI/BstXI)5' » de séquence 5'-GGCGGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCGAATTCCTATGATTATG-3' [SEQ ID N°10] et « TermADH1(SacI)3' » de séquence 5'-GGCGGGAGCTCTGGAAGAACGATTACAACAG-3' [SEQ ID N°11].

10 Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *SacI* et *NotI* et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1-yEGFP3 préalablement digéré par les enzymes *SacI* et *NotI*, produisant le vecteur pCSY226. Le gène codant pour la protéine  $\beta$ TrCP a été purifiée à partir du plasmide pGad1318- $\beta$ TrCP par digestion par les enzymes de restriction *BamHI* et 15 *NotI*. Le fragment a été cloné dans le plasmide pCSY226 préparé par une digestion par les enzymes de restriction *BamHI* et *NotI*. Le vecteur produit a été appelé pCSY226- $\beta$ TrCP.

Une version de ce vecteur contient en plus la séquence d'adressage nucléaire NLS. Celle-ci a été obtenue en synthétisant une paire 20 d'oligonucléotides complémentaire de séquence « NLS-5' » : 5'-ACCTCCAAAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATT-3' [SEQ ID N°12], et « NLS-3' » : 5'-AATTCGACCTTCTCTTCTTTGGAGGT-3' [SEQ ID 25 N°26] réhybridés pour former un ADN double brin. Ce fragment d'ADN a ensuite été incorporé dans le vecteur pCSY226- $\beta$ TrCP digéré par l'enzyme de restriction *ScrFI* pour donner le vecteur pCSY226-NLS- $\beta$ TrCP.

**EXEMPLE 3 : Construction des plasmides permettant l'expression chez la levure des protéines fusions GFP-β-TrCP et GFP-NLS-β-TrCP.**

5

Les plasmides suivants permettent l'expression chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de dérivés de la protéine β-TrCP comprenant une répétition de trois motifs antigénique Flag à leur extrémité氨基-terminal. L'expression de ces protéines fusions est induite en cultivant 10 les cellules de levures hébergeant ces plasmides en présence de 2 à 5 % de galactose dans le milieu de culture pendant 1 à 10 heures.

Un fragment de 700 paires de bases (pb) correspondant au promoteur du gène *PGK1* (pPGK1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été 15 amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « pPGK1-Asp718-5' » de séquence  
5'-GGCGGGTACCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGG-3' [SEQ ID N°13] et  
« pPGK-EcoRI-3' » de séquence  
5'-GGCGGAATTCTGTTTATATTGTTGTAAAAAG-3' [SEQ ID N°14].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Asp718I* et *EcoRI* et inséré dans le plasmide navette *S.cerevisiae-E.coli* pRS304 25 préalablement digéré par les enzymes *Asp718I* et *EcoRI*, produisant le vecteur pRS304-pPGK1.

Un fragment de 100 paires de bases (pb) correspondant à une succession de 3 séquences rapporteuses FLAG (3FLAG) a été amplifié 30 par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir du vecteur p3XFLAG-myc-CMV-24 (Sigma Aldrich), en utilisant les oligonucléotides « 3FLAG-EcoRI-5' » de séquence

5'-GGCGGAATTCACTGGACTACAAAGACCATGACGG-3' [SEQ ID N°15] et « 3FLAGBamHI(SmaI/SrfI PstI)3' » de séquence  
5'-  
GGCGGGATCCGCCCGGGCTCTGCAGCTTGTACATCGTCATCCTTGTA  
5 -3' [SEQ ID N°16]..

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI et inséré dans le plasmide pRS304-pPGK1 préalablement digéré par les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI, produisant le vecteur pRS304-pPGK1-3FLAG.

Un fragment de 340 paires de bases (pb) correspondant au terminateur du gène *ADH1* (*tADH1*) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été amplifié par Polymérase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « TermADH1(NotIBstXI)5' » de séquence 5'-GGCGGCGGCCACCGCGGTGGCGAATTCTTATGATTATG-3' [SEQ ID N°10] et « TermADH1(SacI)3' » de séquence 5'-GGCGGAGCTCTGGAAGAACGATTACAACAG-3' [SEQ ID N°11].

20 Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Sac*I et *Not*I et inséré dans le plasmide pRS304-pPGK1-3FLAG préalablement digéré par les enzymes *Sac*I et *Not*I, produisant le vecteur pCSY614.

25 Le gène codant pour la protéine βTrCP a été purifiée à partir du plasmide pGad1318-βTrCP par digestion par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Not*I. Le fragment a été cloné dans le plasmide pCSY614 préparé par une digestion par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Not*I. Le vecteur produit a été appelé pCSY614-βTrCP.

30

Une version de ce vecteur contient en plus la séquence d'adressage nucléaire NLS. Celle-ci a été obtenue en synthétisant une paire d'oligonucléotides complémentaire de séquence 5'ACCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATT-3' [SEQ ID N°12].

5 réhybridés pour former un ADN double brin. Ce fragment d'ADN a ensuite été incorporé dans le vecteur pCSY614- $\beta$ TrCP digéré par l'enzyme de restriction ScrFI pour donner le vecteur pCSY614-NLS- $\beta$ TrCP.

10 **Exemples 4 à 12 : Mise au point du procédé de criblage selon l'invention.**

**EXEMPLE 4 : Interaction entre les protéines Skp1 de levure et  $\beta$ -TrCP humaine dans les cellules de levure.**

15

L'interaction entre les protéines Skp1 et  $\beta$ -TrCP est visualisée par la technique du double hybride Bartel et al. (in Cellular Interactions in Development : a practical approach (1991), Oxford University Press, Oxford, pp153-179). Des cellules de levure ont été simultanément transformées par le plasmide pGAD- $\beta$ TrCP, qui permet l'expression de la protéine humaine  $\beta$ -TrCP fusionnée au domaine activateur Gal4, par le plasmide pLexSkp1-1 qui permet l'expression de la protéine de levure Skp1 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de la protéine bactérienne LexA, et par le plasmide pSH18-34 qui comprend le gène rapporteur LacZ codant la  $\beta$ -galactosidase, placé sous le contrôle d'opérateurs LexA. La mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase dans des extraits cellulaires réalisées dans de telles cellules démontre que l'expression de ce gène rapporteur est induite par un facteur 15, en comparaison de son expression chez des cellules n'exprimant que l'une 20 des deux protéines de fusion décrites ci-dessus. Cette induction de 25 30

l'expression du gène rapporteur indique que la protéine Skp1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'interagir avec la protéine  $\beta$ -TrCP humaine. L'activité  $\beta$ -galactosidase est exprimée en nmoles de substrat transformé par minute et par mg de protéines (nmoles/ min /mg).

5

**EXEMPLE 5 : localisation, dans les cellules de levure, des protéines humaines I $\kappa$ B $\alpha$  et  $\beta$ -TrCP selon qu'elles sont fusionnées ou non à une séquence NLS de SV40.**

10 Des cellules de levures comportant des plasmides permettant l'expression des protéines hybrides soit GFP-I $\kappa$ B $\alpha$ , soit GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ , soit GFP- $\beta$ -TrCP, soit GFP-NLS- $\beta$ -TrCP à partir du promoteur *GAL1* ont été cultivées en présence de galactose 2 % pendant 2 heures et ont été ensuite observées en microscopie à fluorescence. La position du noyau a été révélée en employant un indicateur coloré spécifique du noyau, le Hoescht 333-42.

15

**EXEMPLE 6 : Phosphorylation de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  dans le noyau des cellules de levure.**

20

L'exemple 6 illustre comment l'adressage de la protéine humaine I $\kappa$ B $\alpha$  dans le noyau des cellules de levure induit sa phosphorylation sur les séries 32 et 36.

25 Des cellules exprimant soit la protéine fusion GFP-I $\kappa$ B $\alpha$ , soit la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$  à partir du promoteur *GAL1* sont cultivées en milieu minimum en présence de 2% galactose pendant 2 heures. Les protéines de ces cellules sont alors préparées selon le protocole décrit par Kuras et al. (Mol. Cell (2002), 10:69-80). Les protéines sont ensuite 30 analysées par la technique de Western blotting à l'aide premièrement,

d'anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine GFP (indiquée « GFP-I $\kappa$ B $\alpha$  ») et de deuxièmement, d'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée sur la sérine 32 de la protéine humaine I $\kappa$ B $\alpha$  (indiquée « P-I $\kappa$ B $\alpha$  »). Un contrôle de la quantité de protéines totales déposée dans chaque puit a été réalisé en analysant ces mêmes protéines à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement la Lysyl-ARNt-synthase de levure (indiquée par « LysRS »). Les protéines issues de la souche de levure parentale n'exprimant aucune protéine fusion (indiquée « contrôle ») servent de témoin de spécificité.

10

#### EXEMPLE 7 : Dégradation de la protéine GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$

L'exemple 7 illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$  dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- $\beta$ -TrCP.

Toutes les souches employées ont été cultivées et analysées en microscopie à fluorescence de manière identique. Les cellules ont été 20 cultivées en milieu riche en présence de galactose comme source de carbone pendant 120 minutes. Au temps t=0, du glucose 2 % est ajouté à la culture et les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (microscope à fluorescence Nikon Eclipse équipé d'un filtre Omega XF116). Toutes les images ont été enregistrées en 25 employant une caméra Hamamatsu® en employant des réglages identiques et analysées avec le logiciel LUCIA G, juste avant (t = 0) et 10, 20 , 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. La fluorescence des protéines fusions GFP-I $\kappa$ B $\alpha$  ou GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$  est indiquée « GFP ». La position du noyau (indiquée « DNA ») dans les cellules a été

révélée en employant un indicateur coloré spécifique du noyau, le Hoescht 333-42.

- A) souche de levure CYS22 (*MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub>::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> sans NLS et localisée dans le cytoplasme des cellules de levure;
- B) souche de levure CYS61 (*MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub>::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-βTrCP::TRP1*) exprimant les protéines fusions GFP-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> et Flag-β-TrCP, localisées dans le cytoplasme des cellules de levure;
- C) souche de levure CYS126 (*MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub>::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-NLS-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> localisée dans le noyau des cellules de levure;
- D) souche de levure CYS135 (*MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-NLS-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub>::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-NLS-βTrCP::TRP1*) exprimant les protéines fusions GFP-NLS-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> et Flag-NLS-β-TrCP localisées dans le noyau des cellules de levure.

**EXEMPLE 8 : Dégradation de GFP-NLS-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> avec ou non co-expression de Flag-NLS-β-TrCP (Résultats par fluorescence).**

L'exemple 8 illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment ou non la protéine fusion tripartite Flag-NLS-β-TrCP.

Les souches de levure identiques à celles décrites dans la figure 4, et cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites figure 4, ont été analysées par microscopie à fluorescence. Pour chaque souche, la fluorescence de 200 cellules (au moins) a été mesurée juste avant (t=0)

et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose, à l'aide du logiciel LUCIA G. Les résultats sont donnés en quantité de fluorescence mesurée par cellule en unité arbitraire.

5    **EXEMPLE 9 : Dégradation de GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> avec ou non co-expression de Flag-NLS-β-TrCP (Résultats d'immuno-empreinte)**

L'exemple 9 illustre par une analyse biochimique de type Western Blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS-β-TrCP. Toutes les souches employées ont été cultivées et analysées de manière identique. Les cellules ont été cultivées en milieu riche en présence de galactose comme source de carbone pendant 120 minutes. Au temps t=0, du glucose 2 % est ajouté à la culture et les protéines totales sont préparées juste avant (t =0) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. Ces protéines sont analysées par la technique de Western blotting en employant un anticorps reconnaissant la partie GFP des protéines fusions contenant I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> (indiquée « GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> ») et un anticorps reconnaissant la partie Flag de la protéine fusion Flag-NLS-β-TrCP (indiquée « Flag-NLS-β-TrCP »). Un contrôle de la quantité de protéines déposée dans chaque puit est réalisé en analysant les mêmes protéines à l'aide d'anticorps reconnaissant la Lysyl-ARNt-synthase de levure (indiquée « LysRS »). Les protéines issues de la souche de levure parentale n'exprimant aucune protéine fusion (indiquée « contrôle ») servent de témoin de spécificité.

A) souche de levure CYS22 (*MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub>::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> sans NLS et localisée dans le cytoplasme des cellules de levure;

B) souche de levure CYS61 (*MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-IkBα::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-βTrCP::TRP1*) exprimant les protéines fusions GFP-IkBα et Flag-β-TrCP, localisées dans le cytoplasme des cellules de levure;

5 C) souche de levure CYS126 (*MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-IkBα::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-NLS-IkBα localisée dans le noyau des cellules de levure;

D) souche de levure CYS135 (*MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-NLS-IkBα::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-NLS-βTrCP::TRP1*) exprimant 10 les protéines fusions GFP-NLS-IkBα et Flag-NLS-β-TrCP localisées dans le noyau des cellules de levure.

**EXEMPLE 10 : Dégradation de GFP-NLS-IkBα mutée sur les résidus sérine 32 et 36 avec ou non co-expression de Flag-NLS-β-TrCP (Résultats d'immuno-empreinte)**

15 L'exemple 10 illustre par une analyse biochimique de type Western blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite mutante GFP-NLS-IkBα[S3236A] dans laquelle les sites de phosphorylation Ser32 et Ser36 ont été remplacés par des résidus Ala, mutations qui dans des cellules 20 humaines rendent la protéine non-dégradable. L'analyse a été faite dans des cellules de levure exprimant également ou non la protéine fusion tripartite Flag-NLS-β-TrCP. Toutes les souches employées ont été cultivées et analysées de manière identique. Les cellules ont été cultivées en milieu riche en présence de galactose comme source de 25 carbone pendant 120 minutes. Au temps t=0, du glucose 2 % est ajouté à la culture et les protéines totales sont préparées juste avant (t=0) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. Ces protéines sont 30 analysées par la technique de Western blotting en employant un anticorps reconnaissant la partie GFP des protéines fusions contenant I kBα[S3236A] (indiqué « GFP-NLS-I kBα[S3236A] ») et un anti-corps

reconnaissant la partie Flag des protéines fusions Flag-NLS- $\beta$ -TrCP (indiqué « Flag-NLS- $\beta$ -TrCP »). Un contrôle de la quantité de protéines déposée dans chaque puit est réalisé en analysant les mêmes protéines à l'aide d'anticorps reconnaissant la Lysyl-ARNt-synthase de levure 5 (indiquée « LysRS »). Les protéines issues de la souche de levure parentale n'exprimant aucune protéine fusion (indiquée « contrôle ») servent de témoin de spécificité.

- A) souche de levure CYS138 (*MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ [S3236A]::URA3*) exprimant la protéine fusion mutante GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ [S3236A] localisée dans le noyau des cellules de levure;
- B) souche de levure CYS139 (*MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ [S3236A]::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-NLS- $\beta$ TrCP::TRP1*) exprimant les protéines fusions GFP-NLS-I $\kappa$ B $\alpha$ [S3236A] et Flag-NLS- $\beta$ -TrCP localisées dans le noyau des cellules de levure.

**EXEMPLE 11 : Dégradation de GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> avec ou non co-expression de Flag-NLS-β-TrCP (Résultats par fluorescence)**

L'exemple 11 illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, 5 la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub>[S3236A] dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS-β-TrCP. Les 2 souches employées (CYS138 et CYS139) ont été cultivées et analysées en microscopie à fluorescence de manière identique. Les cellules sont observées au 10 microscope à épifluorescence (microscope à fluorescence Nikon Eclipse équipé d'un filtre Omega XF116. Toutes les images ont été enregistrées en employant une caméra Hamamatsu® en employant des réglages identiques et analysées avec le logiciel LUCIA G, juste avant (t=0) et 10, 20 , 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. La fluorescence des 15 protéines fusions GFP-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> ou GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> est indiquée « GFP ». La position du noyau (indiquée « DNA ») dans les cellules a été révélée en employant un indicateur coloré spécifique du noyau, le Hoescht 333-42.

**EXEMPLE 12 : Dégradation de GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub> avec ou non co-expression de Flag-NLS-β-TrCP (Résultats par fluorescence)**

L'exemple 12 illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I<sub>k</sub>B<sub>α</sub>[S3236A] dans les souches de levure décrites ci-dessus. Pour chaque souche, la fluorescence de 200 cellules (au moins) a été mesurée juste avant (t=0) 25 et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose à l'aide du logiciel LUCIA G. Les résultats sont donnés en quantité de fluorescence mesurée par cellule en unité arbitraire.

**Tableau 1 : Génotype des souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* construites pour les besoins de la présente invention.**

Souche	Génotype
CC788-2B	<i>MATa, his3, leu2, ura3, trp1.</i>
CYS22	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-<math>\text{I}\kappa\text{B}\alpha</math>::URA3</i>
CYS61	<i>MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-<math>\text{I}\kappa\text{B}\alpha</math>::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-<math>\beta</math>TrCP::TRP1</i>
CYS122	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-<math>\beta</math>TrCP::URA3</i>
CYS123	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-<math>\beta</math>TrCP::URA3</i>
CYS126	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-<math>\text{I}\kappa\text{B}\alpha</math>::URA3</i>
CYS135	<i>MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-NLS-<math>\text{I}\kappa\text{B}\alpha</math>::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-NLS-<math>\beta</math>TrCP::TRP1</i>
CYS138	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-<math>\text{I}\kappa\text{B}\alpha[\text{S}3236\text{A}]</math>::URA3</i>
CYS139	<i>MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-NLS-<math>\text{I}\kappa\text{B}\alpha[\text{S}3236\text{A}]</math>::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-NLS-<math>\beta</math>TrCP::TRP1</i>

**TABLEAU 2 (SEQUENCES)**

SEQ ID N°	Type	Description
1	ADN	GFP-NLS-IkB $\alpha$
2	Protéine	GFP-NLS-IkB $\alpha$
3	ADN	GFP-NLS- $\beta$ TrCP
4	Protéine	GFP-NLS- $\beta$ TrCP
5	ADN	Séquence NLS du grand antigène T du virus SV40
6-16	ADN	Amorces
17	Protéine	Antigène HA
18	Protéine	Monomère FLAG
19	Protéine	Trimère FLAG
20	Protéine	NLS Nucléoplasmine
21	Protéine	NLS répresseur alpha 2 (1)
22	Protéine	NLS répresseur alpha 2 (2)
23	Protéine	NLS Gal4
24	ADN	NLS Ag T SV40
25	ADN	Amorce

**Tableau 3 : Liste des GFP utilisables selon l'invention**

Résidu n°	Spectre de fluorescence												Références										
	Excitation						Emission																
	λ <sub>exc</sub>	λ <sub>em</sub>	λ <sub>exc</sub>	λ <sub>em</sub>	λ <sub>exc</sub>	λ <sub>em</sub>	λ <sub>exc</sub>	λ <sub>em</sub>	λ <sub>exc</sub>	λ <sub>em</sub>	λ <sub>exc</sub>	λ <sub>em</sub>											
26	46	64	65	66	67	68	69	70	72	80	145	146	153	163	164	167	168	175	203	212			
Lys	Phe	Ser	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Ser	Gln	Tyr	Asn	Met	Val	Asn	Ile	Ile	Ser	Thr	Asn	395-470	509-540	Heim et al., 1994	
BFP	Leu		His																		387	450	Quantum
CFP (TRC)	Leu		Trp								Ile	Thr	Ala	His							436	480	
KBTP (Clontech)	Lys	Thr	His																		380	440	Yang et al., 1996 Cormack et al., 1996
RCFP (Clontech)	Leu		Thr																		475	501	Heim et al., 1994- 1996
RCFP	Arg	Lys	Thr	Trp							Ile	Thr	Ala	His							434	474	Miyawaki et al., 1997
EGFP = GFPmut1 (Clontech)			Leu	Thr																488	508	Yang et al., 1998 Cormack et al., 1996	
EYFP (Clontech)																				514	527	Ormo et al., 1997	
GFP05 "SuperBright" (Clontech)																				405	510		

**Tableau 3 (suite) : Liste des GFP utilisables selon l'invention**

**REFERENCES**

Arroyo et al. ( Non publié (1996) soumission directe au MIPS).

Ausubel et al. (in Current Protocols in Molecular Biology, (1990-2004),

5 John Wiley and Sons Inc, N.Y.).

Bailis et al., *Genetics* (1990), **126**:535-547)

Ballard, *Immunol Res.* (2001), **23**:157-166

Bartel et al. (in Cellular Interactions in Development : a practical approach (1991), Oxford University Press, Oxford, pp 153-179).

10 Baud et Karin, *Trends Cell Biol.* (2001), **11** :372-377

Ben Neriah, *Nat Immunol.* (2002 ), **3**:20-26

Bennetzen et Hall (*J. Biol. Chem.* (1982) **257**(6) : 3018-3025).

Bolle et al. (*Yeast* (1992) **8**(3) : 205-213).

Cormack et al. (*Gene* (1996) **173** (1) : 33-38).

15 Hanes et Brent (*Cell* (1989), **57** :1275-1293).

Hanes et Brent (*Cell* (1989), **57**:1275-1293)

Hay et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (1999) **354**:1601-1609

Johnston et Davis (*Mol. Cell. Biol.* (1984) **4** (8) : 1440-1448).

20 Karin et al. (*PNAS* (1984) **81**(2) : 337-341).

Kerjan et al. (*Nucleic Acids Res.*(1986) **14**(20) : 7861-7871).

Kroll et al., *J. Biol. Chem.* (1999), **274**:7941-7945

Kroll et al., *J. Biol. Chem.* (1999), **274**:7941-7945

Kuras et al. (*EMBO J.* (1996) **15**(10) : 2519-2529).

25 Kuras et al. (*Mol. Cell* (2002), **10** :69-80).

Lewis et Manning, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1999) **3**: 489-494

Magnani et al., *Curr. Drug Targets.* (2000) **1**:387-99

Margottin et al. (*Molec. Cell* (1998), **1** :565-574).

Margottin et al. (*Molec. Cell* (1998), **1**:565-574).

30 Nourani et al., *Mol. Cell. Biol.* (1997), **20**:7881-7892).

Patton et al. (*Genes & Dev* (1998), **12** :692-705)

Patton et al. *Genes & Dev* (1998), **12** :692-705.

Rad et al. (*Yeast* (1991) **7**(5) : 533-538).

Rothstein, in *Methods in Enzymology*, (1991), **194**:281-301

Sambrook et al. (in *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition,  
5 (1989), Cold Spring Harbor, N. Y.)

Schiestl et al. (*Curr. Genet.* (1989), **16**:339-346

Sherman et al., in *Methods in Yeast Genetics : a Laboratory Manual*,  
(1979), Cold Spring Harbor, N. Y.

Sikorski et Hieter (*Genetics* (1989) **122**(1) : 19-27).

10 Strausberg et al. (*PNAS* (1999), **99**(26) : 16899-16903

Thomas et al. (*J. Biol. Chem.* (2000) **275**(52) : 40718-40724).

Vidal et al., *Trends Biotechnol.*, (1999), **17**:374-381

Winston et al., *Genes Dev.* (1999), **13**:270-283

Winston et al., *Genes Dev.* (1999), **13**:270-283

15 Yaron et al. (*Nature* (1998) **396**(6711) : 590-594).

**REVENDICATIONS**

1. Procédé pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I<sub>K</sub>B $\alpha$  par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine  $\beta$ -TrCP, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :
  - 5 (a) mettre en contact un agent candidat à tester avec des cellules de levure recombinantes qui expriment dans leur noyau :
    - (i) une protéine de fusion comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  et au moins une première protéine détectable ; et
    - (ii) une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP ;
  - 10 (b) quantifier ladite première protéine détectable dans les cellules de levure, à la fin d'au moins une période de temps prédéterminée après la mise en contact de l'agent candidat avec lesdites cellules ;
  - (c) comparer la valeur obtenue à l'étape (b) avec une valeur témoin obtenue lorsque l'étape (a) est réalisée en l'absence de l'agent candidat.
- 15
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape (a) comprend les étapes suivantes :
  - (a1) cultiver les cellules de levure qui expriment dans leur noyau une protéine de fusion comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  et au moins une première protéine détectable ;
  - 20 (a2) stopper l'expression de ladite protéine de fusion comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  et au moins une première protéine détectable par les cellules de levure ;
  - (a3) mettre en contact les cellules de levures obtenues à la fin de l'étape 25 (a2) avec l'agent candidat à tester.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP durant la totalité des étapes (a1), (a2) et (a3).
- 5 4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3) et n'expriment pas la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP durant l'étape (a1).
- 10 5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3), et
  - (i) n'expriment pas la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP pendant une durée prédéterminée, au début de l'étape (a1) ;
  - 15 (ii) expriment la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP pendant la durée restante de l'étape (a1).
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la protéine détectable comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide  $I\kappa B\alpha$  est choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente et une protéine ayant une activité enzymatique.
- 20 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine détectable consiste en une protéine fluorescente choisie parmi la protéine GFP ou l'un de ses dérivés, la protéine YFP ou l'un de ses dérivés, et la protéine dsRED.
- 25 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine détectable consiste en une protéine ayant une activité enzymatique choisie parmi la luciferase et la  $\beta$ -lactamase.
- 30

9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine détectable consiste en un antigène choisi parmi le peptide Ha et le peptide Flag.

5

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP consiste en une protéine de fusion comprenant aussi une seconde protéine détectable.

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la seconde protéine détectable comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP est choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente et une protéine ayant une activité enzymatique.

15 12. Procédé selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisé en ce que (i) la première protéine détectable comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide I $\kappa$ B $\alpha$  et (ii) la seconde protéine détectable comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP sont distinctes l'une de l'autre.

20

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide I $\kappa$ B $\alpha$  comprend de plus un peptide de localisation nucléaire.

25 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP comprend de plus un peptide de localisation nucléaire.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  consiste en la protéine de séquence SEQ ID N°2.

5    16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15 ; caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP consiste en la protéine de séquence SEQ ID N° 4.

10    17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est un antigène, on quantifie ladite première protéine détectable par détection des complexes formés entre ladite protéine et des anticorps la reconnaissant.

15    18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine fluorescente, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure du signal de fluorescence émis par ladite protéine.

20    19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine ayant une activité enzymatique, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure de la quantité de substrat transformé par ladite protéine.

25    20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que les cellules de levures recombinantes sont transformées avec : respectivement :

30    (1) un premier polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture ouvert codant (i) la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide I<sub>K</sub>B $\alpha$  et (iii) une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert; et

(2) un second polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture ouvert codant (i) une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP, (ii) une séquence de localisation nucléaire et (iii) une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert ;

5

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que la séquence régulatrice contenue dans le premier polynucléotide, la séquence régulatrice contenue dans le second polynucléotide, ou les 10 deux séquences régulatrices, comprenne(nt) un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur.

15

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce le promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *PGK1*, *ADH1*, *TDH3*, *LEU2* et *TEF1*.

20

23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce le promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *CUP1*, *GAL1*, *MET3*, *MET25*, *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

25

24. Procédé selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que le premier polynucléotide comprend la séquence régulatrice *GAL1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide *IκB $\alpha$*  en présence de glucose.

30

25. Procédé selon la revendication 20 à 23, caractérisé en ce que le second polynucléotide comprend la séquence régulatrice *CUP1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP en présence de sulfate de cuivre.

26. Procédé selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes possèdent le premier et le second polynucléotide sous une forme insérée dans leur génome.

5

27. Procédé selon l'une des revendications 1 à 26, caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes possèdent dans leur génome une forme inactivée d'un ou plusieurs gènes contrôlant l'expression de protéines transporteurs insérées dans la membrane plasmique.

10

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le ou les gènes inactivés sont choisis parmi les gènes *PDR1* et *PDR3*.

15

29. Cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide codant qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

20

30. Cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide  $\beta\text{-TrCP}$  et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

31. Cassette d'expression selon l'une des revendications 29 et 30, caractérisée en ce que la séquence régulatrice contenue dans ledit polynucléotide, la séquence régulatrice contenue dans le second polynucléotide, ou les deux séquences régulatrices, comprenne(nt) un

promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur.

32. Cassette d'expression selon la revendication 31, caractérisée en ce  
5 le promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi  
parmi *PGK1*, *TEF1*, *PHO5*, *MET3*, *MET28*, *CUP1*, *GAL1* et *SAM4*.

33. Vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend une cassette  
d'expression selon l'une des revendications 29 à 32.

10 34. Vecteur d'expression selon la revendication 33, caractérisé en ce  
qu'il s'agit du vecteur pCSY226-NLS-I<sub>k</sub>B $\alpha$ .

15 35. Vecteur d'expression selon la revendication 33, caractérisé en ce  
qu'il s'agit du vecteur pCSY226-NLS- $\beta$ -TrCP.

36. Souche de levure recombinante comprenant, sous une forme  
intégrée dans son génome,

20 (i) un premier polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert  
codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le  
polypeptide I<sub>k</sub>B $\alpha$  et au moins une première protéine détectable, et  
une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure  
qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert ; et  
25 (ii) un second polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert  
codant une protéine comprenant le polypeptide  $\beta$ -TrCP et une  
séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui  
dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert ;

30 37. Souche de levure recombinante selon la revendication 36,  
caractérisée en ce qu'elle consiste en la souche de levure CYS135

déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM) sous le numéro d'accès I-3187.

38. Trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine  $\beta$ -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend :

5 (i) un premier vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon la revendication 29; et

(ii) un second vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon la revendication 30.

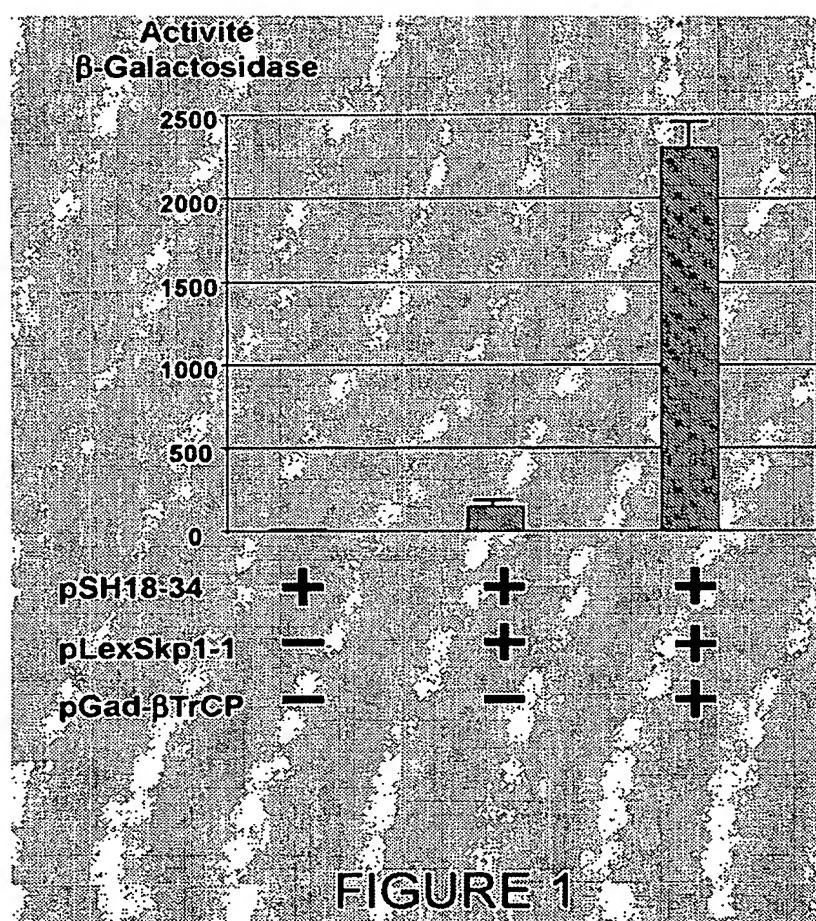
10

39. Trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine  $\beta$ -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes comprenant, sous une forme insérée dans leur génome, respectivement :

15 (i) une cassette d'expression selon la revendication 29; et

(ii) une cassette d'expression selon la revendication 30.

20 40. Trousse ou kit selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes de la souche de levure CYS 135 déposée à la CNCM sous le numéro d'accès I-3187.



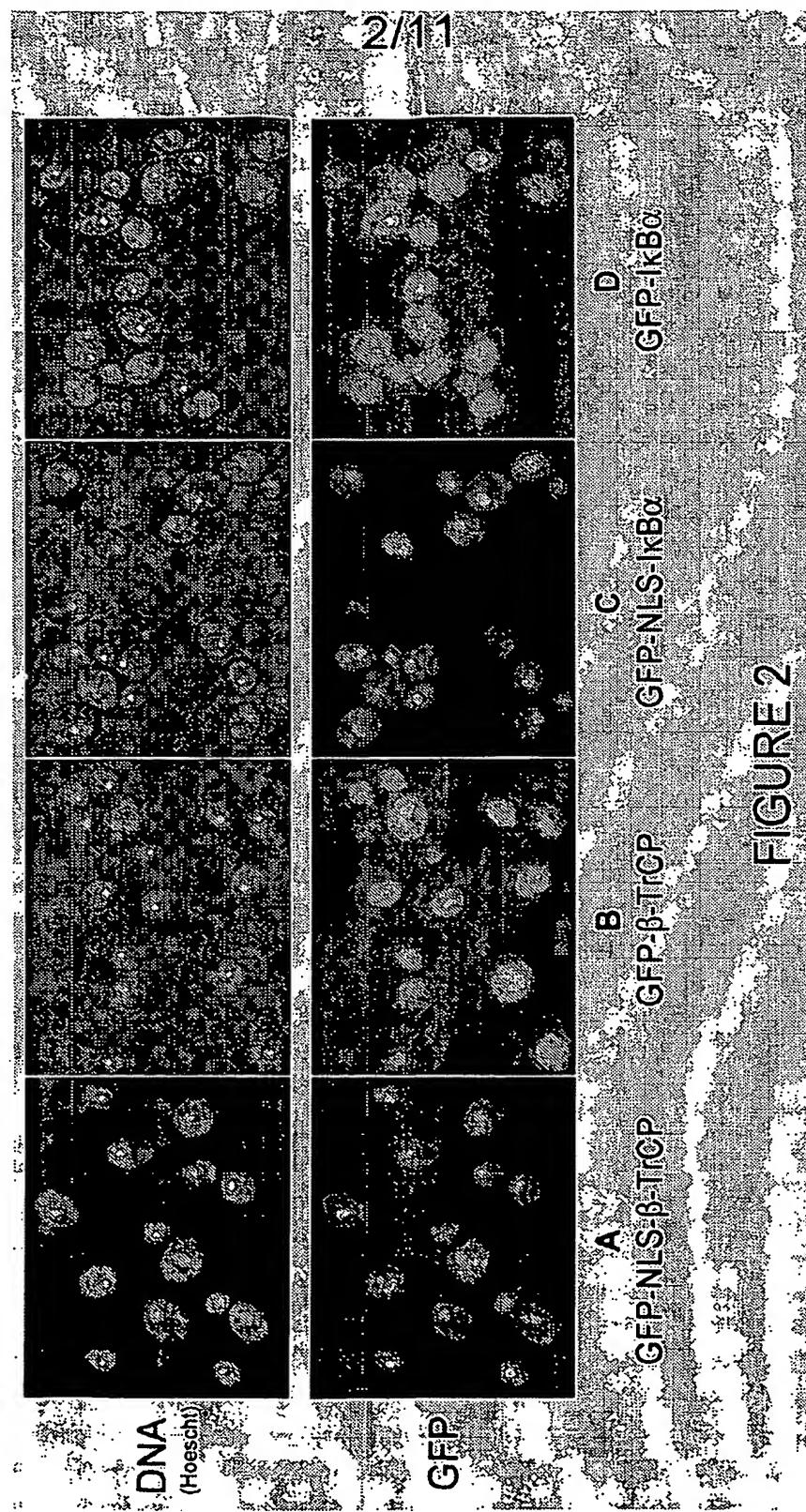
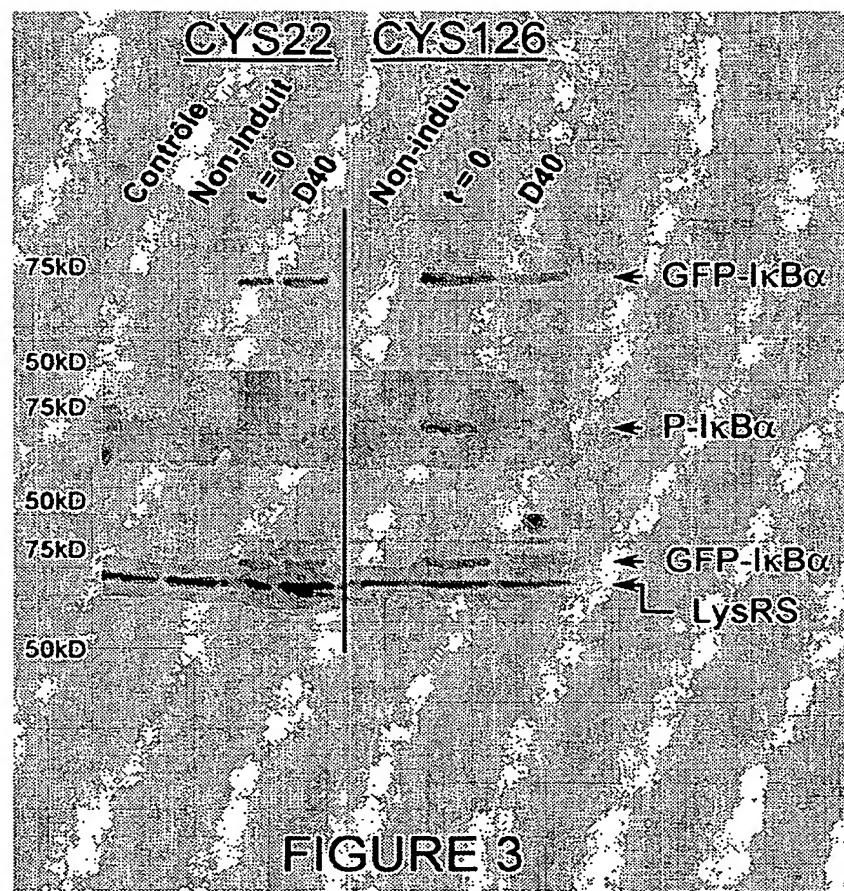


FIGURE 2



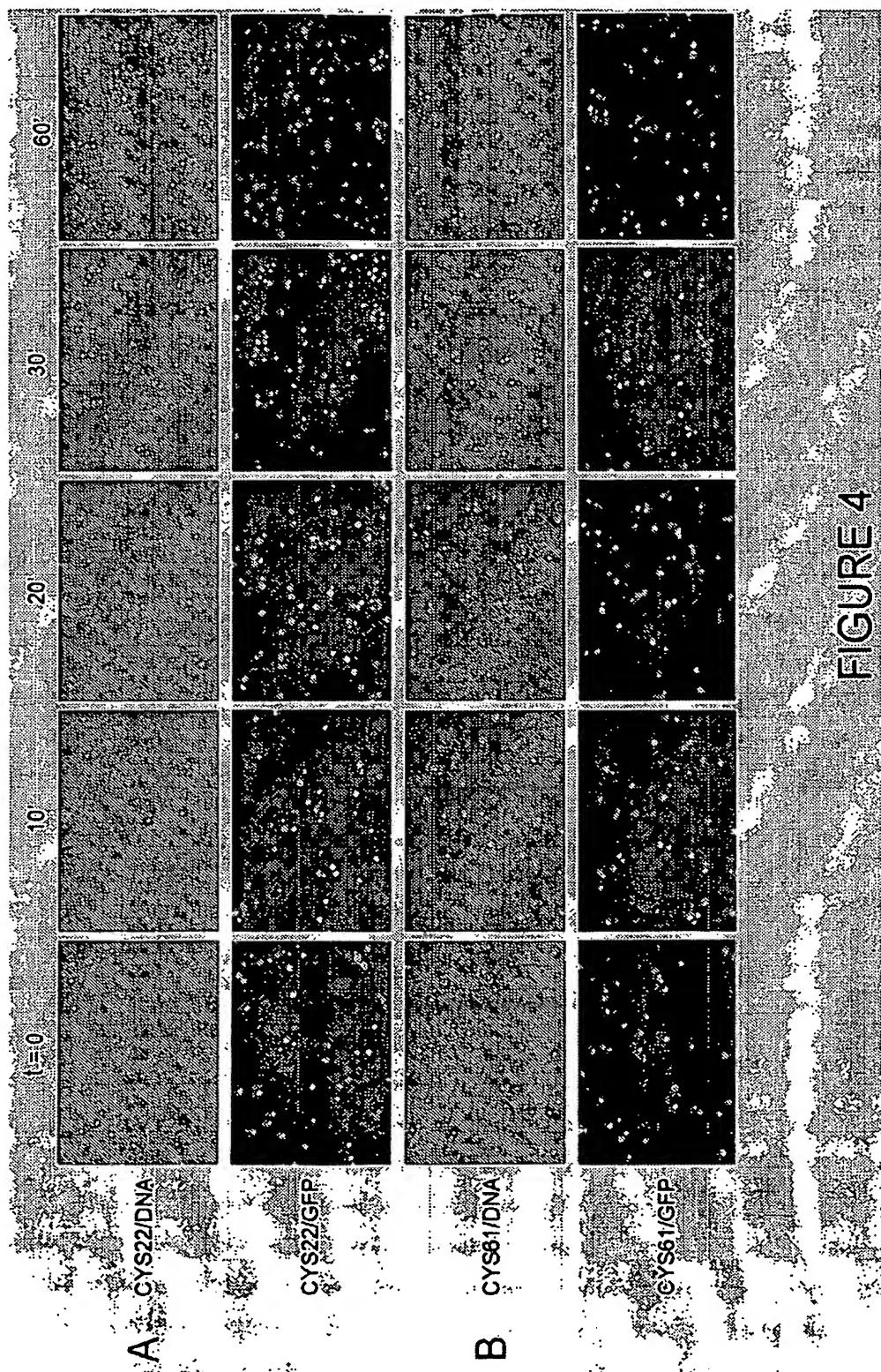


FIGURE 4

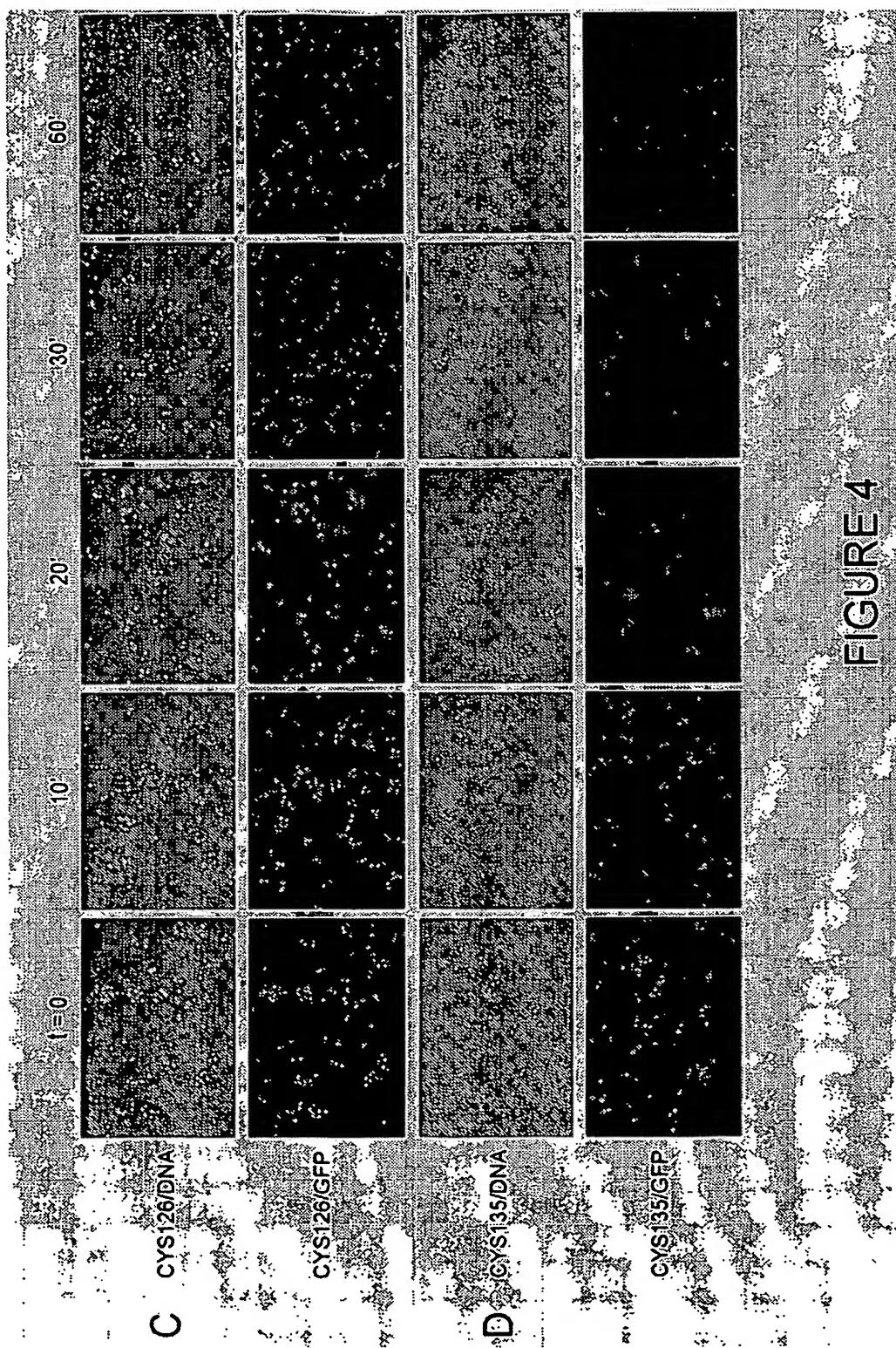
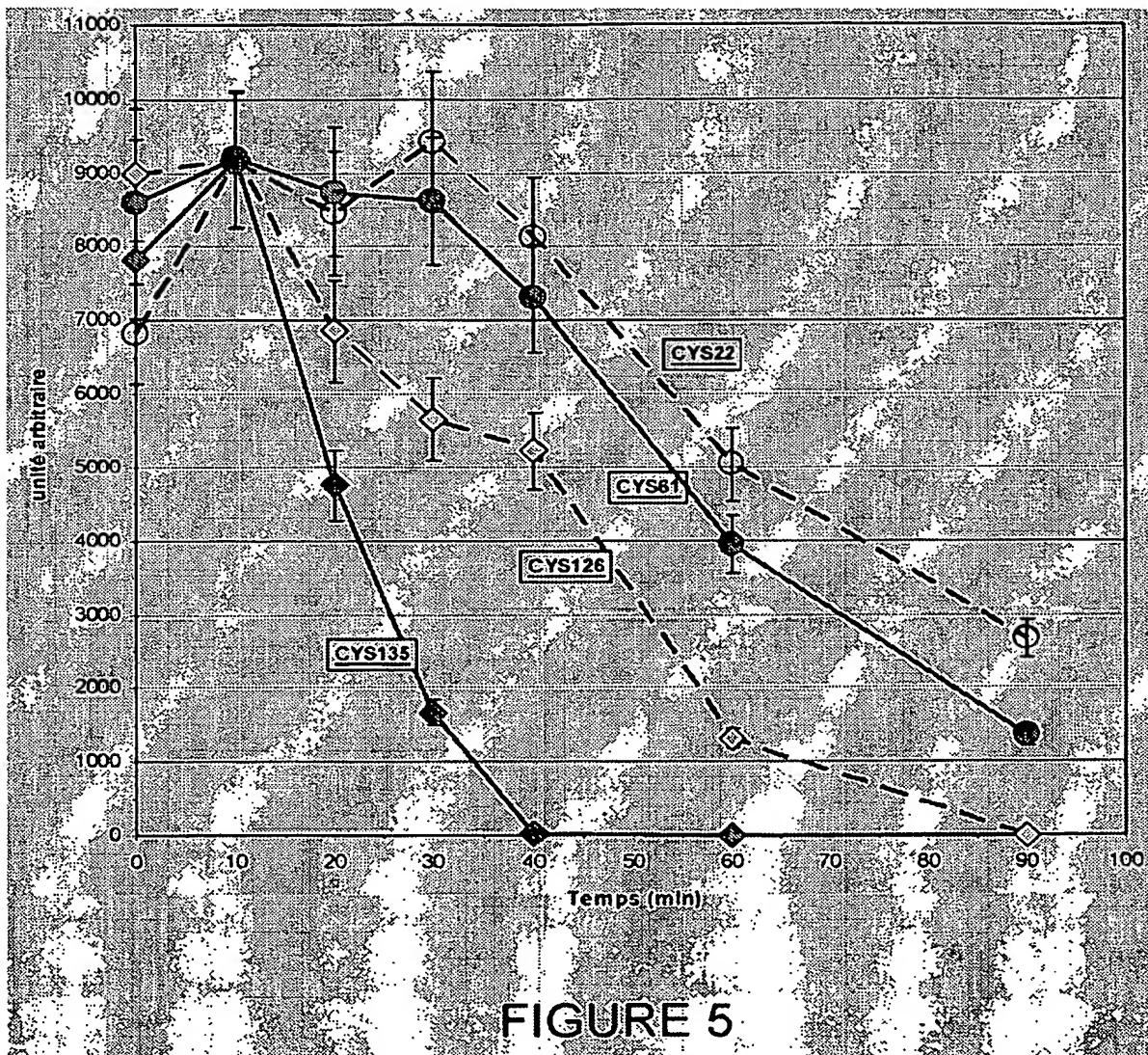


FIGURE 4



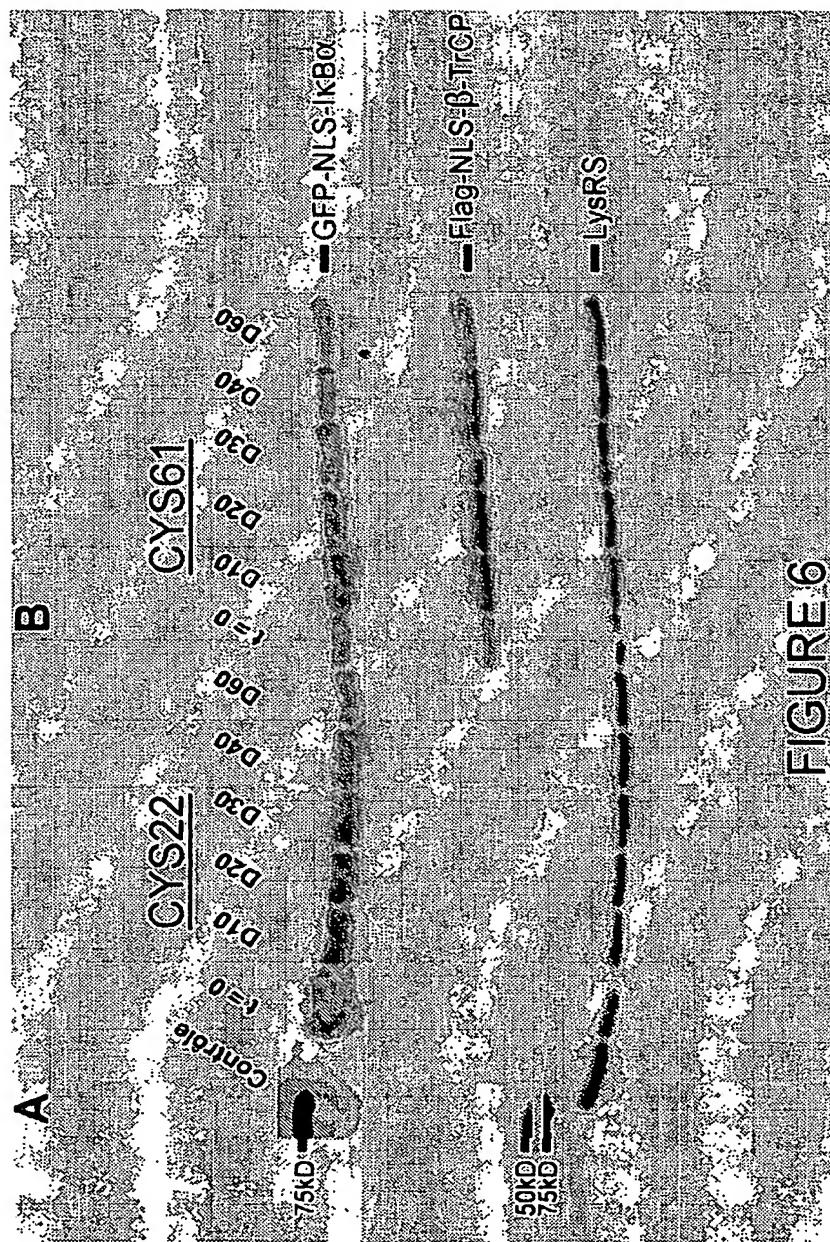


FIGURE 6

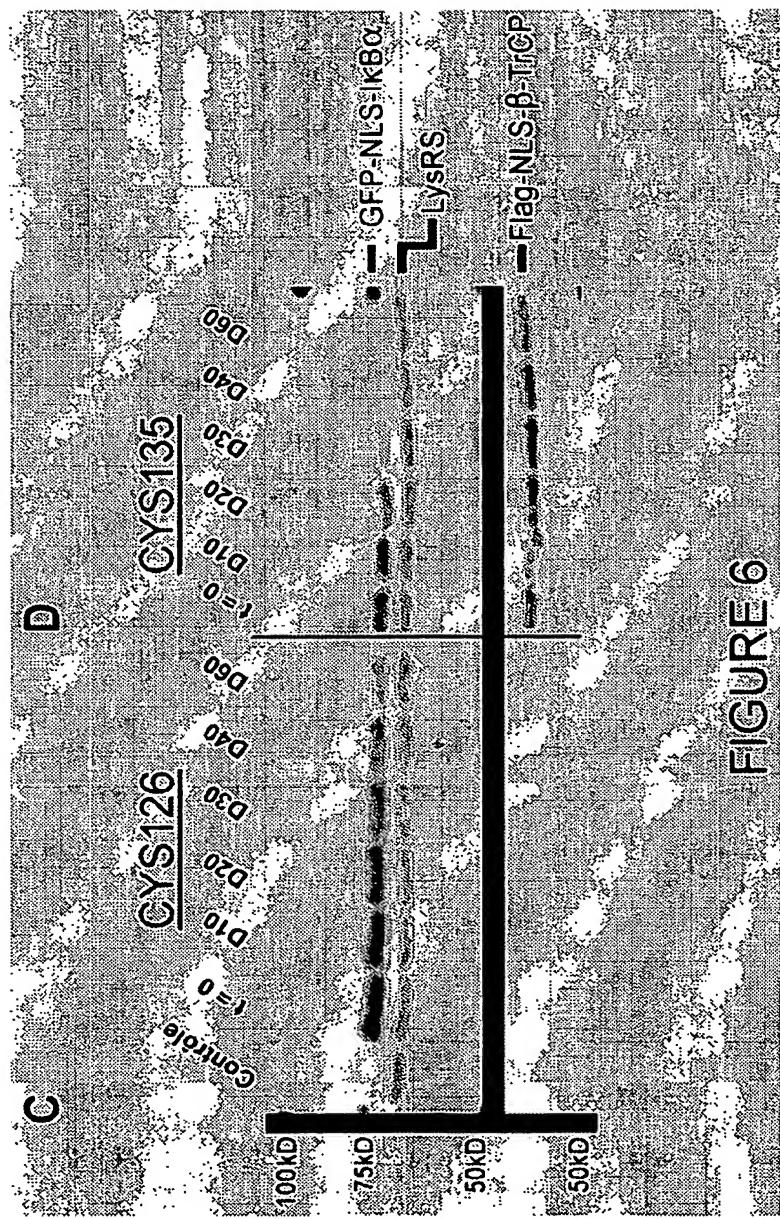


FIGURE 6

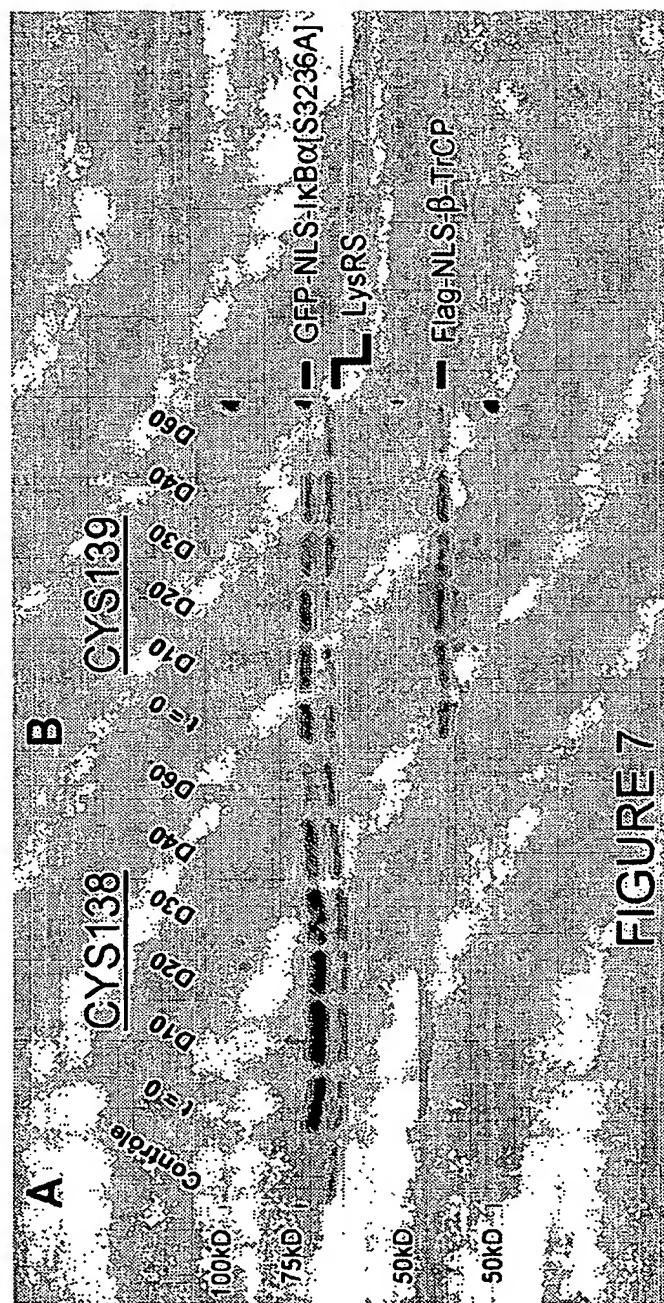


FIGURE 7

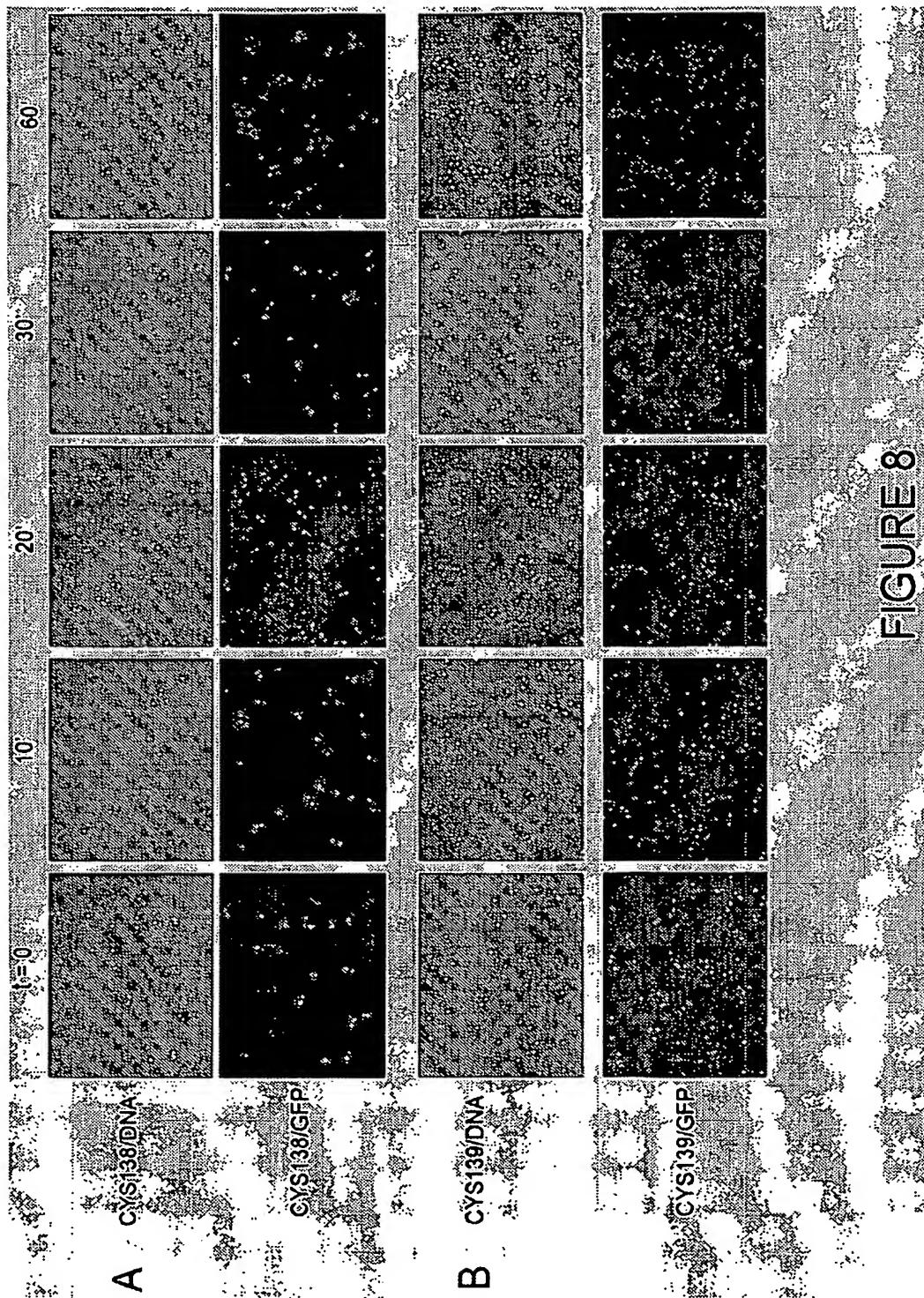
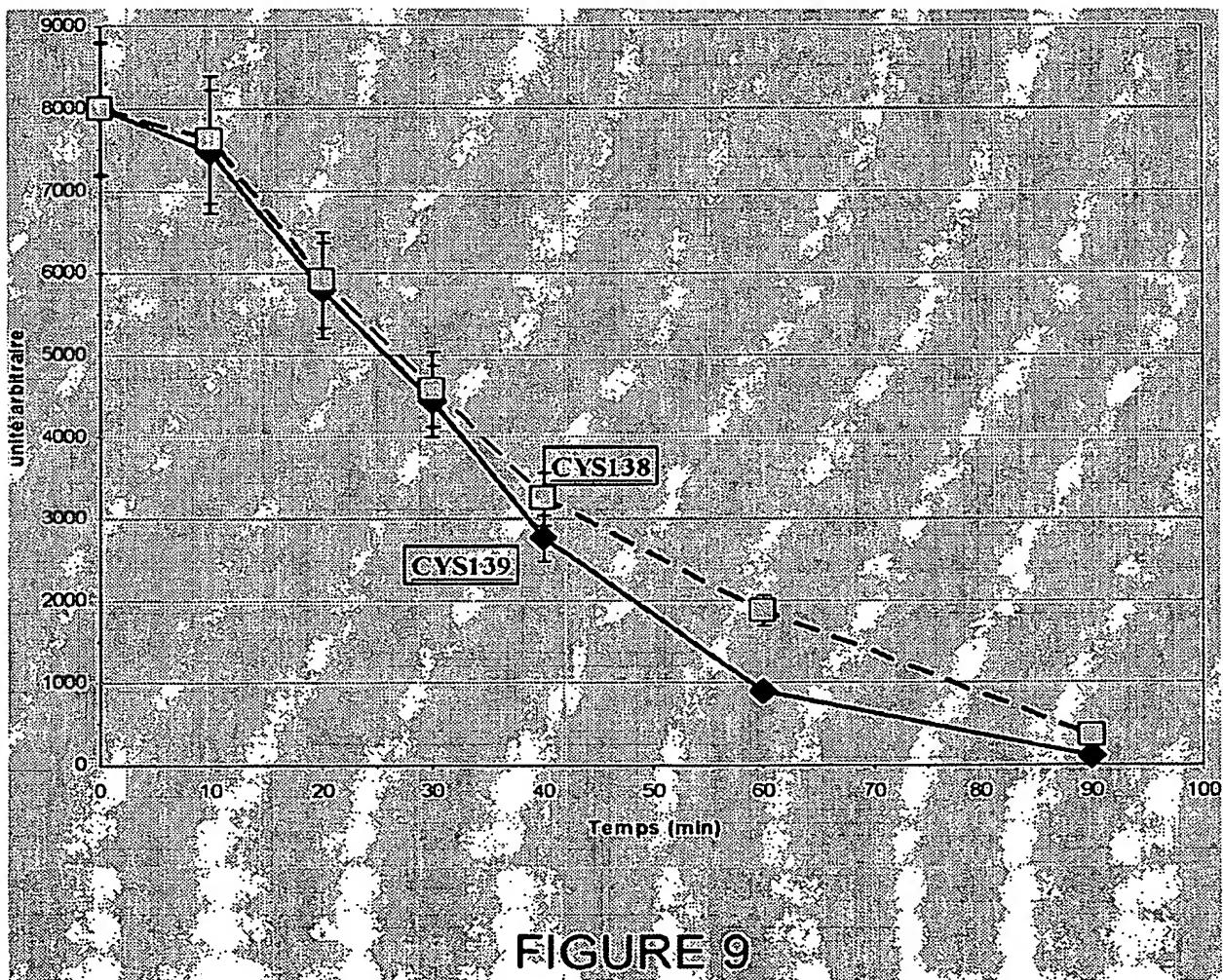


FIGURE 8



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CYTOMICS SYSTEMS

<120> Procédé de criblage in vitro d'agents modulant  
l'ubiquitination de la protéine I-Kappa-B-Alpha et  
moyens destinés à la mise en oeuvre dudit procédé

&lt;130&gt; CYTOMICS

<140>  
<141>

&lt;160&gt; 25

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 1719  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle<220>  
<223> Description de la séquence  
artificielle:GFP-NLS-IkB<sub>a</sub><400> 1  
atgtctaaag gtgaagaatt attcaactgg tttgtcccaa ttttggttga attagatgg 60  
gatgttaatg gtcacaaaatt ttctgtctcc ggtgaagggt aagggtatgc tacttacgg 120  
aaattgacct taaaatttat ttgtactact ggtaaaattgc cagttccatg gccaaccta 180  
gtcactactt tcggttatgg tggtaatgt tttgcttagat acccagatca tatgaaacaa 240  
catgactttt tcaagtctgc catgccagaa ggttatgttc aagaaagaac tattttttc 300  
aaagatgacg gtaactacaa gaccagagct gaagtcaagt ttgaaggtga taccttagtt 360  
aatagaatcg aattaaaagg tattgatttt aaagaagatg gtaacattt aggtcacaaa 420  
ttggaataca actataactc tcacaatgtt tacatcatgg ctgacaaca aaagaatgg 480  
atcaaagtta acttcaaaaat tagacacaac attgaagatg gttctgtca attagctgac 540  
cattatcaac aaaatactcc aatttgtgtat ggtccagttct tgtaaccaga caaccattac 600  
ttatccactc aatctgcctt atccaaagat ccaaacgaaa agagagaccat catggcttg 660  
ttagaatttg ttactgtgc tggattaccatgtt catgtatgg atgaattgtt caaactgcag 720  
agcccaccc caaaaaagaa gagaaaggc gaattgggcf gatccatgtt ccaggcggcc 780  
gagcggcccc aggagtggc catggagggc ccccgccgac ggctgaagaa ggagcggcta 840  
ctggacgacc gccacgacag cggcctggac tccatgaaag acgaggagta cgagcagatg 900  
gtcaaggagc tgcaggagat cgcctcgag ccgcaggagg tgccgcgcgg ctccggagccc 960  
tggaaaggcage agctcaccga ggacggggac tgcgttgc acttggccat catccatgaa 1020  
gaaaaggcagc tgaccatggc agtgatccgc caggtgaagg gagacctggc tttccctcaac 1080  
ttccagaaca acctgcagca gactccactc cacttggctg tgatcaccaa ccagccagaa 1140  
attgctgagg cacttctggg agctggctgt gatcctgagc tccgagactt tcgagggaaat 1200  
accccccctac accttgcctg tgagcaggc tgccctggcca gcgtgggagt cctgactcag 1260  
tcctgcacca ccccgccaccc ccactccatc ctgaaggcta ccaactacaa tggccacacg 1320  
tgtctacact tagcctctat ccatggctac ctggcatcg tggagctttt ggtgtccttg 1380  
gggtctgatg tcaatgctca ggagccctgt aatggccgga ctgcccctca cctcgcagtg 1440  
gacctgaaaa atcctgaccc ggtgtcactc ctgttgaagt gtggggctga tgtaacaga 1500  
gttacctacc agggctattc tccctaccag ctcacccctgg gccgccccaaag cacccggata 1560  
cagcagcagc tggggccagct gacactagaa aacccctcaga tgctgccaga gagtgaggat 1620  
gaggagagct atgacacaga gtcagagttc acggagttca cagaggacga gctgccctat 1680  
gatgactgtg tgtttggagg ccagcgtctg acgttatga 1719<210> 2  
<211> 572  
<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence  
artificielle:GFP-NLS-IkBa

<400> 2

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val  
1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu  
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys  
35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe  
50 55 60

Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln  
65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg  
85 90 95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val  
100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile  
115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn  
130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly  
145 150 155 160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val  
165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro  
180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser  
195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Gln  
225 230 235 240

Ser Pro Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Leu Gly Gly Ser Met  
245 250 255

Phe Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro Arg  
260 265 270

Asp Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly  
275 280 285

Leu Asp Ser Met Lys Asp Glu Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu Leu  
290 295 300

Gln Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro  
305 310 315 320

Trp Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu Ala  
325 330 335

Ile Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln Val  
340 345 350

Lys Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln Thr  
355 360 365

Pro Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu Ala  
370 375 380

Leu Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly Asn  
385 390 395 400

Thr Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Gly  
405 410 415

Val Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu Lys  
420 425 430

Ala Thr Asn Tyr Asn Gly His Thr Cys Leu His Leu Ala Ser Ile His  
435 440 445

Gly Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp Val  
450 455 460

Asn Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Val  
465 470 475 480

Asp Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly Ala  
485 490 495

Asp Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu Thr  
500 505 510

Trp Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Leu Gly Gln Leu Thr  
515 520 525

Leu Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser Tyr  
530 535 540

Asp Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro Tyr  
545 550 555 560

Asp Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu  
565 570

<210> 3  
<211> 2583  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence  
artificielle:GFP-NLS-bTRCP

&lt;400&gt; 3

atgtctaaag gtgaagaatt attcaactggt gttgtcccaa ttttggttga attagatgg 60  
 gatgttaatg gtcacaaatt ttctgtctcc ggtgaagggtg aaggtgtatgc tacttacgg 120  
 aaattgacct taaaatttat ttgtactact ggtaaattgc cagttccatg gccaaccta 180  
 gtcactactt tcggttatgg tggtaatgt tttgcttagat acccagatca tatgaaacaa 240  
 catgacttt tcaagtctgc catgccagaa ggttatgttc aagaaagaac tattttttc 300  
 aaagatgacg gtaactacaa gaccagagct gaagtcaagt ttgaagggtg taccttagtt 360  
 aatagaatcg aattaaaagg tattgattt aaagaagatg gtaacatttt aggtcacaaa 420  
 ttggaaataca actataactc tcacaatgtt tacatcatgg ctgacaaca aaagaatgg 480  
 atcaaagttt acttcaaaaat tagacacaac attgaagatg gttctgttca attagctgac 540  
 cattatcaac aaaatactcc aattgggtat ggtccagtc tggttaccaga caaccattac 600  
 ttatccactc aatctgcctt atccaaagat ccaaacgaaa agagagacca catggcttg 660  
 tttagaattt tgactgctgc tggatttaccatgatgatggttaatgtt caaactgcag 720  
 agcccaccc taaaaaagaa gagaaagggtc gaattggcg gatccatgg cccggccgag 780  
 ggggtctgc aagagaaggc actcaagttt atgtgttca tgccctggc tctgtggctg 840  
 ggctgttcca gcctggcgga cagcatgct tcgctgcgt gcctgtataa cccaggact 900  
 ggcgcactca cagtttcca gaattcctca gagagagaag actgtataaa tggcgaaccc 960  
 ccttaggaaga taataccaga aagaattttt ctttagacaga catacaacag ctgtgccaga 1020  
 ctctgcttaa accaagaaaac agtattttt gcaagactg ctatgaagac tgagaattgt 1080  
 gtggccaaaaa caaaacttgc caatggcaact tccaggatgtt ttgtgccccaa gcaacggaaa 1140  
 ctctcagcaa gctataaaaa gaaaaaggaa ctgtgtgtca aatacttttga gcagtggca 1200  
 gagtcagatc aagtgaattt tggaaatcat cttatatccc aaatgtgtca ttaccaacat 1260  
 gggcacataaa actcgatct taaaacctatg ttgcagagag atttcataac tgctctgcca 1320  
 gctcgggat tggatcatat tgctgagaac attctgtcat acctggatgc caaatacta 1380  
 tggactgtt aacttgtgtt caagggatgg taccggatgtt cctctgtatgg catgctgtgg 1440  
 aagaagctta tcgagagaat ggtcaggaca gattctctgt ggagaggctt ggcagaacga 1500  
 agaggatggg gacagtattt attcaaaaaac aaacctctgt acgggaatgc tcctccaaac 1560  
 tcttttataa gggacttta ccctaaaattt atacaagaca ttgagacaat agaatcta 1620  
 tggagatgtt gaagacatag ttacagaga attcaactgcc gaagtggaaac aagcaaaagg 1680  
 gtttactgtt tacatgttga tgatcgaaaa atagaagcg gccttcgaga caacacaatc 1740  
 aagatctggg ataaaaaacac attggaaatgc aagcaattc tcacaggcca tacaggttca 1800  
 gtcctctgtc tccaggatgtt tgagagatg atcataacag gatcatcgga ttccacggc 1860  
 agagtgtggg atgttaatac aggtgaaatg ctaaacacgt tgattcacca ttgtgaagca 1920  
 gttctgcact tgcgttcaa taatggcatg atgggtaccc gctccaaaga tcgttccatt 1980  
 gctgtatggg atatggcctc cccaaactgac attaccctcc ggagggtgtt ggtcggacac 2040  
 cgagctgtt tcaatgttgc agactttgtt gacaagtaca ttgtttctgc atctggggat 2100  
 agaactataa aggtatggaa cacaagtact tgtgaatttg taaggacccaaatggacac 2160  
 aaacggggca ttgcgttgc gcatgttgc gacaggctgg tagtgatgtt ctcatctgac 2220  
 aacactatac gattatggg catagaatgtt ggtcatgtt tacgatgtttt agaaggccat 2280  
 gggaaatgg tgcgttgc tgcgttgc aacaagggaa tagtcgttgc ggcctatgtat 2340  
 gggaaaatgg aagtgtggaa tcttgggtt gcttggacc cccgtgtcc tgcaggacac 2400  
 ctctgttca gggacccttgc gggacttcc ggaagatgtt ttcgactaca gtttggatgaa 2460  
 ttccagattt tcaatgttgc acaatccctca tctggactt cctaaatgtat 2520  
 ccagctgccc aagctgaacc cccccgttcc ctttcgttca catacacta catctccaga 2580  
 tga 2583

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 860

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence  
artificielle:GFP-NLS-bTRCP

&lt;400&gt; 4

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val  
1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu  
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys  
35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe  
50 55 60

Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln  
65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg  
85 90 95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val  
100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile  
115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn  
130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly  
145 150 155 160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val  
165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro  
180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser  
. 195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Gln  
225 230 235 240

Ser Pro Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Leu Gly Gly Ser Met  
245 250 255

Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu Lys Phe Met Cys  
260 265 270

Ser Met Pro Arg Ser Leu Trp Leu Gly Cys Ser Ser Leu Ala Asp Ser  
275 280 285

Met Pro Ser Leu Arg Cys Leu Tyr Asn Pro Gly Thr Gly Ala Leu Thr  
290 295 300

Ala Phe Gln Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro  
305 310 315 320

Pro Arg Lys Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn

	325	330	335
Ser Cys Ala Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser			
340	345	350	
Thr Ala Met Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn			
355	360	365	
Gly Thr Ser Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser			
370	375	380	
Tyr Glu Lys Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser			
385	390	395	400
Glu Ser Asp Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys			
405	410	415	
His Tyr Gln His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln			
420	425	430	
Arg Asp Phe Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala			
435	440	445	
Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu			
450	455	460	
Leu Val Cys Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp			
465	470	475	480
Lys Lys Leu Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly			
485	490	495	
Leu Ala Glu Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro			
500	505	510	
Pro Asp Gly Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro			
515	520	525	
Lys Ile Ile Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly			
530	535	540	
Arg His Ser Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly			
545	550	555	560
Val Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg			
565	570	575	
Asp Asn Thr Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg			
580	585	590	
Ile Leu Thr Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu			
595	600	605	
Arg Val Ile Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp			
610	615	620	
Val Asn Thr Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala			
625	630	635	640
Val Leu His Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys			
645	650	655	

Asp Arg Ser Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr  
 660 665 670  
 Leu Arg Arg Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp  
 675 680 685  
 Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys  
 690 695 700  
 Val Trp Asn Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His  
 705 710 715 720  
 Lys Arg Gly Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser  
 725 730 735  
 Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala  
 740 745 750  
 Cys Leu Arg Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg  
 755 760 765  
 Phe Asp Asn Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys  
 770 775 780  
 Val Trp Asp Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr  
 785 790 795 800  
 Leu Cys Leu Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu  
 805 810 815  
 Gln Phe Asp Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile  
 820 825 830  
 Leu Ile Trp Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro  
 835 840 845  
 Arg Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg  
 850 855 860

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Simian virus 40

<400> 5  
 ccaaaaaaga agagaaaggt c

21

<210> 6  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 6  
 gctgggtacc ttaataatca tattacatgg catta

35

<210> 7  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 7  
ggcggattc tatagtttt tctccttgac gtta 34

<210> 8  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 8  
ggtcggaatt catgtctaaa ggtgaagaat tattc 35

<210> 9  
<211> 46  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 9  
ggcgggatcc gcccgccgc tgcaaggatc acaattcatc catacc 46

<210> 10  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 10  
ggcggcggcc gccaccgcgg tgggcgaatt tcttatgatt tatg 44

<210> 11  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 11  
ggcggagctc tgaaagaacg attacaacag 30

<210> 12  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 12  
acctccaaaa aagaagagaa aggtcgaatt 30

<210> 13  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 13  
ggcggttacc gtgagtaagg aaagagttag g 31

<210> 14  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 14  
ggcggaattc tgtttatat ttgttgaaa aag 33

<210> 15  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 15  
ggcggaattc atggactaca aagaccatga cg 33

<210> 16  
<211> 46  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 16  
ggcggttacc gcccgggctc tgcagttgt catcgcatc cttgt 46

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:HA

<400> 17  
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
1 5

<210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FLAG

<400> 18  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 19  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FLAG

<400> 19  
Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp  
1 5 10 15  
Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
20

<210> 20  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 20  
Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 21  
<211> 13

<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 21  
Met Asn Lys Ile Pro Ile Lys Asp Leu Leu Asn Pro Gln  
1 5 10

<210> 22  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:NLS  
<400> 22  
Val Arg Ile Leu Glu Ser Trp Phe Ala Lys Asn Ile Glu Asn Pro Lys  
1 5 10 15  
Leu Asp Thr

<210> 23  
<211> 74  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:NLS  
<400> 23  
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu  
1 5 10 15  
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu  
20 25 30  
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro  
35 40 45  
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu  
50 55 60  
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg  
65 70

<210> 24  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 24

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

<210> 25

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 25

aattcgacct ttctttttt ttttggaggt

30

1

## BEST AVAILABLE COPY

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°  
PCT/FR2005/050165

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12Q1/25 C07K14/47 G01N33/566

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C12Q C07K G01N C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99/04033 A (BEER ROMERO PEGGY ; GLASS SUSAN J (US); MITOTIX INC (US); ROLFE MARK () 28 janvier 1999 (1999-01-28) page 22, ligne 8 - page 25, ligne 16 -----	29, 33
X	WO 99/38969 A (ARENZANA SEISDEDOS FERNANDO ; CONCORDET JEAN PAUL (FR); INST NAT SANTE) 5 août 1999 (1999-08-05) page 13, ligne 21 - ligne 26 -----	30, 33
A	EP 1 182 251 A (YISSUM RES DEV CO) 27 février 2002 (2002-02-27) le document en entier -----	1-40
A	WO 98/36070 A (YISSUM RES DEV CO ; SIGNAL PHARM INC (US)) 20 août 1998 (1998-08-20) le document en entier -----	1-40
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 août 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/08/2005

## Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

## Fonctionnaire autorisé

Jacques, P

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/050165

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	STRACK P ET AL: "SCFBETA-TRCP AND PHOSPHORYLATION DEPENDENT UBIQUITINATION OF IKAPPABALPHA CATALYZED BY UBC3 AND UBC4" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 19, 20 juillet 2000 (2000-07-20), pages 3529-3536, XP000991550 ISSN: 0950-9232 le document en entier ----- 	1-40
A	WINSTON JEFFREY T ET AL: "The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpa and beta-catenin and stimulates IkappaBalpa ubiquitination in vitro" GENES AND DEVELOPMENT, vol. 13, no. 3, 1 février 1999 (1999-02-01), pages 270-283, XP002308533 ISSN: 0890-9369 le document en entier ----- 	1-40
A	KROLL MATHIAS ET AL: "Inducible degradation of IkappaBalpa by the proteasome requires interaction with the F-box protein h-betaTrCP" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 12, 19 mars 1999 (1999-03-19), pages 7941-7945, XP002308507 ISSN: 0021-9258 le document en entier ----- 	1-40
A	LEWIS A J ET AL: "New targets for anti-inflammatory drugs" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, vol. 3, 1999, pages 489-494, XP002197383 ISSN: 1367-5931 le document en entier ----- 	1-40

## TEST AVAILABLE COPY

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/050165

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9904033	A	28-01-1999	US 6060262 A AU 8405598 A WO 9904033 A1		09-05-2000 10-02-1999 28-01-1999
WO 9938969	A	05-08-1999	FR 2774377 A1 FR 2774378 A1 AU 2169499 A CA 2370098 A1 EP 1049775 A1 WO 9938969 A1 JP 2002501746 T US 6730486 B1		06-08-1999 06-08-1999 16-08-1999 05-08-1999 08-11-2000 05-08-1999 22-01-2002 04-05-2004
EP 1182251	A	27-02-2002	EP 1182251 A1 AU 2234302 A WO 0216633 A2 US 2004014026 A1		27-02-2002 04-03-2002 28-02-2002 22-01-2004
WO 9836070	A	20-08-1998	US 5932425 A AU 6659198 A CA 2281920 A1 EP 1009824 A1 JP 2001512319 T WO 9836070 A1		03-08-1999 08-09-1998 20-08-1998 21-06-2000 21-08-2001 20-08-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

---

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**